

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE PSICOLOGÍA
Departamento de Psicobiología



TESIS DOCTORAL

Tratamientos farmacológicos en la coadministración de alcohol y cocaína: efectos en la expresión de genes en el córtex prefrontal de la rata

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Víctor Echeverry Alzate

Directores
José Antonio López Moreno
Elena Giné Domínguez

Madrid, 2016

TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGÍA

TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS EN LA COADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL Y COCAÍNA: EFECTOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES EN EL CÓRTEX PREFRONTAL DE LA RATA

VÍCTOR ECHEVERRY ALZATE

DIRECTORES

Dr. JOSÉ ANTONIO LÓPEZ MORENO

(Dpto. Psicobiología. UCM)

Dra. ELENA GINÉ DOMÍNGUEZ

(Dpto. Biología Celular. UCM)

Madrid, España. 2015

A mi madre y mis abuelos.

A ti GBC, por nosotros.

“Between stimulus and response there is a space.
In that space is our power to choose our response.
In our response lie our growth and our freedom.”

Viktor E. Frankl

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, el Dr. José Antonio López Moreno y la Dra. Elena Giné Domínguez, por permitirme alcanzar este objetivo, brindándome su apoyo, conocimiento y orientación durante estos años. A los miembros del equipo (PBG LAB) Rubén, Dani, y Marta porque todos han aportado su granito de arena (laboral o personal) en algún momento del proceso de elaboración de esta tesis, y en especial a Kora y Javi, con quienes he pasado los mejores días de experimentos interminables, charlas inagotables y risas, ¡así da gusto! También a Isa, María, y Alex, por todo el tiempo que disfrutamos y trabajamos juntos, creciendo en lo profesional y en lo personal, mano a mano.

Hago extensivo mi agradecimiento a las personas que han pasado por nuestro laboratorio durante alguna temporada, Susanna Pietropaolo, Marta Celorrio, con especial mención a mi valenciana Lucía Martí, y a los miembros de los equipos con quienes compartimos laboratorio: Laura, María, Patxi, Toni, Noemí, y Mayte. Sin olvidar a nuestra Anita, a quien agradezco toda su ayuda profesional y personal durante estos años.

Quiero agradecer de forma especial a la Dra. Raquel Gómez, porque con ella empecé a disfrutar de la investigación y ¡aquí estoy!, al Dr. Ángel Santos, a quien aprecio enormemente, y porque los días de trabajo a su lado están repletos de nuevo conocimiento. A la Dra. Rosario Moratalla por permitirme estar en su laboratorio durante unos meses, aprender, y descubrir a todas “mis chicas” del B-01: Noe, Irene, Lula, Sara, Marco, Emi, y especialmente a Isa, quien ya formaba parte de mi vida previamente, brindándome su ternura, sonrisa, profesionalidad, e interesantes puntos de vista en cada momento de los que seguimos compartiendo.

Fuera del ámbito laboral, quiero dar las gracias a todos mis amigos, que han estado a mi lado y me han brindado su apoyo en todos estos años: Yulie, Merche, Jorge y Laura, los de siempre. Rafi, Juanma, Manu, Jose y Oscar, de un “ambiente” especial, porque el compartir estos 13 años hace que los considere mi familia. A mis compañeros de carrera, y de máster, Carmen y Carlos, y a los integrantes del grupo “C. party”, gracias por esos momentos.

Por último, agradezco enormemente a toda mi familia, Echeverry Alzate, Bermúdez de Castro, Fernández de Valderrama, y en especial a mis hermanos, sus parejas, mis tías, y Álvaro, porque sobran los motivos. ¡GRACIAS!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN	17
SUMMARY	21
I. INTRODUCCIÓN	25
1. Neurobiología de la adicción	27
1.1. Adicción	27
1.2. Sistema cerebral de recompensa	30
2. Corteza prefrontal y adicción	
2.1. Funciones de la corteza prefrontal y sus alteraciones en la adicción	35
2.2. Organización estructural de la corteza prefrontal en roedores	36
3. Alcohol	
3.1. El alcohol como droga de abuso	38
3.2. Farmacología del alcohol	40
4. Cocaína	
4.1. La cocaína como droga de abuso	48
4.2. Farmacología de la cocaína	50
5. Interacciones entre Alcohol y Cocaína	
5.1. Farmacología de la interacción alcohol-cocaína: Cocaetileno	56
5.2. Efectos del consumo simultáneo de alcohol y cocaína	58
6. Tratamientos farmacológicos	
6.1. Tratamientos farmacológicos en la adicción al alcohol	61
6.2. Tratamientos farmacológicos en la adicción a la cocaína	68
6.3. Tratamientos farmacológicos en la adicción al alcohol y a la cocaína	74
7. Regulación de la expresión génica y adicción	
7.1. Genes de expresión temprana y adicción	77
7.2. Epigenética	80
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	95
III. RESULTADOS	101
Artículo 1	103
Artículo 2	115
IV. DISCUSIÓN GENERAL	133
V. CONCLUSIONES FINALES	151

VI. BIBLIOGRAFÍA	155
ANEXO 1: ARTÍCULOS	187

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEME	Anhidroecgonina metil ester
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxasole-4-propiónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNInc	ARNs largos no codificantes
ARNnc	ARN no codificante
ATV	Área tegmental ventral
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BChE	Butirilcolinesterasa
BE	Benzoilecgonina
CCA	Corteza cingulada anterior
c-Fos	Proto-oncogen Fos
CIE-10:	Clasificación internacional de enfermedades
CocE	Esterasa de cocaína bacterina
CocH	Hidrolasa de cocaína
Cox-2	Ciclooxigenasa 2
CPF	Corteza prefrontal
CPG15	Neuritin; <i>candidate plasticity gene 15</i> ; <i>Nrn1</i>
CRF	Factor liberador de corticotropina
CRE	del inglés <i>Cyclic-AMP response-element</i>
CREB	del inglés <i>Cyclic-AMP response-element-binding protein</i>
CYP2E1	Citocromo P4502E1
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
Drd1	Receptor de dopamina D1
Drd2	Receptor de dopamina D2

Dmap1	del inglés <i>DNA methyltransferase 1-associated protein</i>
DNMT	ADN metiltransferasa
DSM-III-R	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, tercera edición revisada
DSM-IV	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, cuarta edición
DSM-V	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, quinta edición
EDADES	Encuesta domiciliaria sobre alcohol y drogas en España
EMA	Agencia europea de medicamentos
EME	Ecgonina metil ester
FDA	del inglés <i>Food and drug administration</i>
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GABA _A	Ácido gamma-aminobutírico de tipo A
GIRKs	Canales de potasio de rectificación interna acoplados a proteínas G
Glu	Glutamato
Grik1	del inglés <i>kainate receptor gene containing the GluK1 subunit</i>
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histona desacetilasa
HDM	Histona desmetilasa
HMT	Histona metiltransferasa
IAD	Corteza insular agranular dorsal
IAV	Corteza insular agranular ventral
ICSS	Autoestimulación intracraneal
IEGs	Genes de expresión temprana (del inglés <i>immediate early genes</i>)
IL	Corteza infralímbica
LTP	Potenciación a largo plazo (del inglés <i>long-term potentiation</i>)
MeCP2	del inglés <i>Methyl-CpG-binding protein 2</i>
MEF2	Factor potenciador de miocito-2
MEOS	Sistema microsomal de oxidación del etanol

5-mC	5-metilcitosina
miARN	microARN
NAc	Núcleo accumbens
nAChRs	Receptores nicotínicos de acetilcolina
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NAD ⁺ (P)	Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)
Narp	del inglés <i>Neuronal activity-regulated pentraxin</i>
NE	Norepinefrina o noradrenalina
NET	Transportador de norepinefrina
NFκB	Factor nuclear κB
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPY	Neuropéptido Y
OEDT	Observatorio español de drogas y toxicomanías
OL	Corteza orbital lateral
OLV	Corteza orbital lateral ventral
OM	Corteza orbital medial
Oprm1	Receptor opioide, Mu 1
OV	Corteza orbital ventral
POMC	Proopiomelanocortina
PrC	Corteza precentral
PrL	Corteza prelímbica
SER	Serotonina, o 5-hidroxitriptamina (5-HT)
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema nervioso central
Th	Tirosina hidroxilasa
Trdmt1	del inglés <i>tRNA aspartic acid methyltransferase 1</i>
UNODC	Oficina de las naciones unidas contra la droga y el delito
18S	ARN ribosómico 18S

RESUMEN

El consumo de sustancias psicoactivas, y en concreto el consumo simultáneo de alcohol y cocaína, es una práctica frecuente en la población general. Así mismo, se ha visto que el consumo de cocaína incrementa el riesgo de desarrollar dependencia de alcohol, y viceversa. Actualmente existen 4 tratamientos farmacológicos aprobados para la dependencia de alcohol, siendo el disulfiram el primer tratamiento aprobado, posteriormente lo fueron la naltrexona y el acamprosato, y recientemente el nalmefeno. Por otra parte, estudios clínicos recientes han señalado que el topiramato, un fármaco aprobado para el tratamiento de la epilepsia y la prevención de la migraña, podría ser efectivo para el tratamiento de la dependencia de alcohol o cocaína. Sin embargo, para esta última no existe aún ninguna terapia farmacológica aprobada, y se conoce muy poco acerca de la eficacia de estas farmacoterapias en la codependencia de alcohol y cocaína.

Por lo tanto, en la presente tesis doctoral se abordan varias hipótesis sobre este campo de estudio, que son:

- 1) El tratamiento farmacológico con naltrexona, acamprosato, y topiramato será efectivo en la reducción del consumo de alcohol en ratas.
- 2) La exposición crónica a cocaína aumentará el consumo de alcohol y alterará la actividad locomotora de los animales.
- 3) El tratamiento farmacológico con naltrexona y topiramato reducirá el incremento del consumo de alcohol y la estimulación psicomotora inducidos por cocaína.
- 4) La naltrexona y el topiramato alterarán la expresión de genes asociados con la actividad neuronal y genes epigenéticos en la CPF.

Para verificar estas hipótesis se plantearon una serie de objetivos específicos llevados a cabo en 2 estudios, en los cuales se utilizó un modelo de autoadministración operante de alcohol con administración concomitante de cocaína (i.p) en ratas Wistar macho. Todos los tratamientos farmacológicos fueron administrados por vía oral, y se analizó la expresión génica en la CPF, debido a su implicación en la conducta adictiva y su sensibilidad a los tratamientos farmacológicos objeto de estudio.

En el primer estudio se realizó una curva dosis-respuesta de naltrexona (1, 3, y 10 mg/kg) y acamprosato (35, 70, y 210 mg/kg) sobre el consumo de alcohol, siendo la dosis más alta de naltrexona la única que mostró eficacia, sin deberse este efecto a alteraciones motoras. La cocaína (2.5, 10, y 20 mg/kg) incrementó de manera dosis dependiente el consumo de alcohol de los animales, y revirtió la eficacia de la naltrexona. Por otra parte, el efecto de sensibilización motora inducido por la administración crónica de cocaína no fue reducido por la naltrexona. Por último, el análisis de los niveles de ARNm de varios genes de expresión temprana en la CPF, reveló una reducción de la expresión del factor de transcripción *C-fos*, y un incremento de la expresión de *COX-2* y *Homer1a*, inducidos por el consumo crónico de alcohol.

En el segundo estudio se exploraron los efectos de dosis crecientes de topiramato (2.5-40 mg/kg) sobre el consumo de alcohol y la coadministración de cocaína (20 mg/kg). El topiramato no redujo el consumo de alcohol a ninguna de las dosis estudiadas, pero sí fue eficaz en la prevención del incremento del consumo inducido por cocaína, sin causar alteraciones motoras. Esta eficacia fue observada cuando el tratamiento con topiramato tenía lugar antes de la sesión de autoadministración de alcohol, pero no cuando se administraba antes de la inyección de cocaína. De forma similar, este tratamiento farmacológico no alteró la sensibilización motora inducida por cocaína, ni el metabolismo de la misma. Sin embargo, el tratamiento crónico con topiramato redujo los niveles de alcohol en sangre, y afectó a la memoria de los animales en el test de reconocimiento de objetos. Por último, se analizó la expresión génica de 3 grupos de genes: a) relacionados con mecanismos de control epigenético, b) proteínas diana del topiramato, e c) implicados en la neurotransmisión dopaminérgica y opioide. El alcohol incrementó la expresión génica de *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dmap1*, y *Trdmt1*, efecto que fue revertido por el topiramato o la cocaína. Esta última provocó un aumento de la expresión de *Hdac2* y *Grik1*, y la coadministración de cocaína y topiramato produjo este mismo efecto en *Drd2*, *Th*, y *Oprm1*.

Por lo tanto, estos datos nos permiten concluir que el tratamiento con naltrexona es el único capaz de reducir el consumo de alcohol en las ratas, según nuestras condiciones experimentales. Por otra parte, la coadministración crónica de alcohol y cocaína produce un incremento del consumo de alcohol que solo se ve reducido por el tratamiento con topiramato. La actividad locomotora no se ve afectada por los tratamientos farmacológicos estudiados. Sin embargo, la exposición crónica a cocaína

provoca un efecto de sensibilización motora en los animales, que no es bloqueado por la naltrexona ni el topiramato. Además, el tratamiento crónico con topiramato en dosis moderadas/altas puede perjudicar la memoria de tipo episódica.

Mientras que el metabolismo de la cocaína no se ve afectado por el tratamiento crónico con topiramato, este último aumenta el metabolismo del alcohol, independientemente de la presencia de cocaína. Respecto a la expresión génica en la CPF se puede concluir, por una parte, que los cambios en la expresión de *C-fos* pueden ser un biomarcador útil en la dependencia de alcohol, y por otra, que el alcohol podría estar alterando tanto el mantenimiento de los patrones de metilación como la metilación *de novo* en la CPF, a través del aumento de la expresión génica de *Dnmt1* y *Dnmt3a*, un efecto que es prevenido por la administración de topiramato y/o cocaína. Así mismo, el incremento de la expresión de *Hdac2*, inducido por la cocaína, podría estar mediando un silenciamiento génico asociado a esta droga.

Por último, los efectos conductuales de la coadministración de topiramato y cocaína se ven acompañados por una alteración de la expresión de varios genes implicados en la adicción (*Drd2*, *Th*, y *Oprm1*).

SUMMARY

The use of psychoactive substances, in particular the simultaneous use of alcohol and cocaine is a common practice in the general population. Likewise, it has been shown that cocaine increases the risk of alcohol dependence and vice versa. Currently there are 4 approved pharmacological treatments for alcohol dependence, being the first approved treatment disulfiram, subsequently naltrexone and acamprosate, and more recently nalmefene. Moreover, recent clinical studies have indicated that topiramate, a medication approved for the treatment of epilepsy and migraine prevention, may be effective in the treatment of alcohol or cocaine dependence. However, for the latter, there is still no approved drug therapy, and also there is very few knowledge about the efficacy of these pharmacotherapies in the co-dependency of alcohol and cocaine.

Therefore, in this doctoral thesis several hypotheses about this field of study were addressed, specifically:

- 1) The treatment with naltrexone, acamprosate, and topiramate is effective in reducing alcohol consumption in rats.
- 2) Chronic exposure to cocaine will increase alcohol consumption and alter locomotor activity in animals.
- 3) Pharmacological treatment with naltrexone and topiramate will reduce the cocaine-induced increase in alcohol consumption and psychomotor stimulation.
- 4) Naltrexone and topiramate will alter the expression of genes associated with neural activity and epigenetic genes in the PFC.

To verify this hypothesis a number of specific objectives have been stated and performed in two studies, using a model of operant alcohol self-administration with concomitant administration of cocaine (i.p.) in male Wistar rats. All drug treatments were administered orally, and gene expression was analyzed in the PFC, due to its involvement in the addictive behavior and sensitivity to the drug treatments under study.

In the first study a dose-response curve of naltrexone (1, 3, and 10 mg/kg) and acamprosate (35, 70, and 210 mg/kg) on alcohol consumption was performed, showing efficacy only the highest dose of naltrexone, which was not due to motor impairments. Cocaine (2.5, 10, and 20 mg/kg) dose-dependently increased alcohol consumption of

animals and reversed the efficacy of naltrexone. The effect of motor sensitization induced by chronic cocaine administration was not prevented by naltrexone. Finally, analysis of the mRNA levels of several immediate early genes in the PFC, revealed that chronic alcohol consumption reduced gene expression of the transcription factor *C-fos*, and increased expression of *COX-2* and *Homer1a*.

In the second study the effects of increasing doses of topiramate (2.5-40 mg/kg) on alcohol consumption and the co-administration of cocaine (20 mg/kg) were explored. Topiramate did not reduce the consumption of alcohol at any of the studied doses, but it was effective in preventing the cocaine-induced increased consumption, without causing motor impairment. This efficacy was observed when topiramate was administered before the alcohol self-administration session, but not when it was administered before the cocaine injection. Similarly, this pharmacological treatment did not alter cocaine-induced motor sensitization, or cocaine metabolism. However, chronic treatment with topiramate reduced blood alcohol levels, and showed a tendency to alter memory in the object recognition test. Finally, the gene expression of three groups of genes was analyzed: a) related to epigenetic control mechanisms, b) for topiramato targets, and c) involved in dopaminergic and opioid neurotransmission. Alcohol increased gene expression of *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dmap1*, and *Trdmt1*. This effect was reversed by topiramate or cocaine. The latter caused an increased expression of *Hdac2* and *Grik1*, and the co-administration of cocaine and topiramate produced the same effect in *Drd2*, *Th*, and *Oprm1*.

Therefore, these data allow us to conclude that only the treatment with naltrexone is able to reduce alcohol consumption in rats, according to our experimental conditions. Furthermore, co-administration of chronic alcohol and cocaine produces an increase in alcohol consumption which only is reduced by treatment with topiramate. Locomotor activity is not affected by the pharmacological treatments studied. However, chronic exposure to cocaine causes motor sensitization, which is not blocked neither by naltrexone nor topiramate. In addition, chronic treatment with topiramate in moderate/high doses may impair episodic-like memory.

While the metabolism of cocaine is not affected by chronic treatment with topiramate, the latter increases the metabolism of alcohol regardless of the presence of cocaine. Regarding the gene expression in the PFC it can be concluded, first, that changes in the

expression of *C-fos* can be a useful biomarker for alcohol dependence, and secondly, that alcohol could be altering both, the maintenance of methylation patterns as well as *de novo* methylation in the PFC, by increasing gene expression of *Dnmt3a* and *Dnmt1*, an effect which is prevented by the administration of topiramate and/or cocaine. Likewise, cocaine-induced increase in *Hdac2* expression could be mediating gene silencing associated with this drug.

Finally, the behavioral effects of the co-administration of topiramate and cocaine are accompanied by an alteration in the expression of several genes involved in addiction (*Drd2*, *Th*, and *Oprm1*).

I. INTRODUCCIÓN

1. NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN

1.1. Adicción

En la actualidad, se suelen distinguir tres formas diferentes de consumo de drogas: 1) uso ocasional, controlado o social, 2) abuso de drogas o uso perjudicial, y 3) drogadicción (Le Moal y Koob, 2007). La drogadicción, o dependencia de sustancias (término utilizado en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales en su cuarta edición, DSM-IV), es una enfermedad crónica y recidivante caracterizada por la búsqueda y uso compulsivo de la droga, pérdida de control sobre el límite de consumo de la misma, y la aparición de estados emocionales negativos (disforia, ansiedad e irritabilidad) cuando no se tiene acceso a la sustancia (Koob y Le Moal, 1997).

Se han propuesto, en base a datos experimentales, dos enfoques teóricos principales para explicar la transición a la adicción:

- Teorías centradas en la droga: según estas teorías, la adicción es principalmente una consecuencia del consumo de drogas y es el resultado de los cambios psicofarmacológicos producidos en el individuo debido al uso crónico de la misma. Estas teorías se centran en cambios específicos inducidos por las drogas, entre los que se incluyen procesos como la tolerancia (Roberts et al., 2002), la sensibilización (Robinson y Berridge, 1993, 2008; Wise y Bozarth, 1987), la abstinencia y alostasis (Koob y Le Moal, 2005, 2008), y los cambios en procesos cognitivos (Bechara, 2001, 2005; Jentsch y Taylor, 1999; Robbins et al., 2008). Estos cambios se ven apoyados por las importantes alteraciones neurobiológicas a nivel molecular, celular, sináptico, y de vías, que se producen como consecuencia del consumo crónico de drogas (Everitt y Wolf, 2002; Hyman et al., 2006; Kauer y Malenka, 2007; Nestler, 1992, 1994, 2000; Wolf, 1998, 2002, 2010;).
- Teorías centradas en el individuo: de acuerdo con este enfoque teórico, las drogas son una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la adicción. Por tanto, la adicción sería el resultado de una respuesta patológica a la droga generada en algunos individuos debido a que presentan un fenotipo biológico vulnerable. Las principales diferencias entre los postulados de esta familia se refieren al grado de relevancia etiológica otorgado a factores genéticos,

ambientales, su interacción, y a factores relacionados con la edad del individuo, entre los que se incluyen factores perinatales, de la adolescencia, etc. (Bardo et al., 2013; Barron et al., 2005; Caspi y Moffitt, 2006; Crabbe et al., 1999, 2010; Doremus-Fitzwater et al., 2010; Ellembroek et al., 2005; Foroud et al., 2010; Piazza et al., 1996; van der Kam et al., 2005).

Piazza y Deroche-Gamonet (2013) proponen una teoría general de transición a la adicción, que ofrece un enfoque teórico unificador de las dos familias de teorías anteriormente mencionadas. Para estos autores, la transición a la adicción es el resultado de una interacción, en tres etapas, entre la vulnerabilidad del individuo y el grado/cantidad de exposición a la droga. De forma resumida, en la primera etapa se da el uso recreacional y esporádico de la droga, tratándose de un proceso de aprendizaje mediado por la sobreactivación de los sustratos neurobiológicos de los refuerzos naturales. En la segunda etapa, algunos individuos vulnerables consumen la droga de manera intensificada, en escalada, y mantenida en el tiempo, lo que induciría una sensibilización del incentivo y un estado alostático, provocando en el individuo una fuerte necesidad de búsqueda y consumo de la droga. Por último, la tercera etapa está caracterizada por la pérdida de control del consumo de la droga y la adicción completa, y se debe a un segundo fenotipo vulnerable del sujeto.

Respecto a la terminología usada en el ámbito de la adicción, es de destacar que en la última versión del DSM (DSM-V) se realizaron varias modificaciones en la terminología diagnóstica: se ha sustituido el término “dependencia”, utilizado desde el DSM-III-R, por el de “trastornos por consumo de sustancias”. Además, la palabra “adicción” fue omitida de la terminología oficial del diagnóstico de consumo de sustancias, debido a su definición incierta y su posible connotación negativa.

Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10), no incorpora la adicción entre los términos diagnósticos. Sin embargo, permite que el término “dependencia” sea utilizado en referencia a todas las sustancias psicoactivas (farmacodependencia, drogodependencia, dependencia de sustancias químicas, dependencia del consumo de sustancias) o en el caso de una droga o clase de drogas concreta, por ejemplo dependencia del alcohol. Además, debido a su ambigüedad, el término “abuso” no está recogido en la CIE-10, excepto para las sustancias que no producen dependencia (OMS, 2008). En la Tabla 1 se

resumen los criterios diagnósticos actuales para los trastornos por consumo de sustancias según el DSM-V.

Tabla 1. Criterios diagnósticos para los trastornos por consumo de sustancias. DSM-V

Cumplir dos o más de los siguientes criterios dentro de un periodo de doce meses.

Trastorno *Leve*: dos o tres síntomas. *Moderado*: cuatro o cinco síntomas. *Grave*: seis o más.

Grupos de Criterios:

Control deficitario sobre el consumo

1. Consumo de grandes cantidades de sustancia o durante un tiempo más prolongado de lo previsto.
2. Expresar deseos insistentes de dejar o de regular el consumo, con múltiples esfuerzos fallidos por disminuirlo o abandonarlo.
3. Invertir gran parte del tiempo intentando conseguir la sustancia, consumiéndola o recuperándose de sus efectos.
4. Existe un deseo intenso de consumo.

Deterioro Social

5. Incumplimiento de los deberes fundamentales (académicos, laborales o domésticos).
6. Consumir a pesar de los problemas recurrentes o persistentes (sociales o interpersonales) causados o exacerbados por los efectos del consumo.
7. Reducir o abandonar actividades sociales, ocupacionales o recreativas debido al consumo de sustancias.

Consumo de Riesgo de la Sustancia

8. Consumo recurrente de la sustancia incluso en situaciones en las que esta provoca un riesgo físico.
9. Consumo continuado a pesar de saber que se padece un problema físico o psicológico recurrente o persistente que se puede originar o exacerbar por el consumo.

Criterios Farmacológicos

10. Síntomas de Tolerancia.
11. Síndrome de abstinencia.

Datos epidemiológicos

El uso de sustancias psicoactivas está muy extendido en nuestra sociedad. Según datos del Informe Mundial sobre las Drogas, publicado por la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC, 2014), en el año 2012 aproximadamente 183.000 muertes estaban relacionadas con las drogas, correspondiéndose este dato con una tasa de mortalidad de alrededor de 40 muertes por millón, en la población comprendida entre 15 y 64 años. Según este informe, entre 162 y 324 millones de personas, en ese mismo margen de edad, consumieron alguna sustancia ilegal al menos una vez a lo largo del último año, tratándose principalmente de sustancias del grupo del cannabis, opioides,

cocaína, o estimulantes de tipo anfetamínico. Por otra parte, el número de personas con consumo problemático (consumidores habituales y personas con trastornos de consumo o dependencia) se sitúa entre los 16 y los 39 millones.

Si nos centramos en España, encontramos que en el año 2013 (Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España, EDADES) las sustancias psicoactivas con mayor prevalencia de consumo, en la población de entre 15 y 65 años, fueron en primer lugar el alcohol (93.1%) seguido por el tabaco (73.1%). Respecto a las drogas de comercio ilegal, el cánnabis y la cocaína tienen la mayor prevalencia de consumo de alguna vez en la vida, siendo un 30.4% y un 10.2% respectivamente (Observatorio Español de Drogas y Toxicomanías [OEDT], 2013). Por otra parte, es de destacar que, según datos del año 2011, el consumo de tranquilizantes, realizado alguna vez en la vida, ha aumentado sustancialmente hasta alcanzar un 17.1% de la población consultada (OEDT, Informe anual 2012).

Además, la Encuesta sobre uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias en España (ESTUDES, datos del 2012) indica que el alcohol, el tabaco y el cánnabis son las sustancias más consumidas por los estudiantes de entre 14 y 18 años. Este problema adquiere mayor relevancia si tenemos en cuenta la temprana edad de inicio de consumo de sustancias psicoactivas. El alcohol y el tabaco muestran un inicio de consumo antes de cumplir los 14 años, mientras que el éxtasis, la cocaína, las anfetaminas o los alucinógenos comienzan ya con 15 años cumplidos (OEDT, Informe Nacional, 2013).

Es importante señalar que, según datos del año 2013 (EDADES, OEDT) en la población de entre 15 y 65 años, el policonsumo de dos o tres sustancias, en los últimos doce meses, fue del 30.2% y 9.3% respectivamente. En concreto, el alcohol está asociado con una mayor prevalencia de consumo de otras drogas, sobre todo si se trata de consumo de alcohol de tipo intensivo, estando presente en el 90% de los policonsumos.

1.2. Sistema cerebral de recompensa

La drogadicción puede ser considerada como una enfermedad del sistema cerebral de recompensa (Vetulani, 2001). Esta circuitería cerebral de recompensa fue descubierta por Olds y Milner (1954), gracias a la autoestimulación intracraneal (ICSS, por sus siglas en inglés). Estos investigadores querían estudiar si la estimulación de la sustancia reticular podría facilitar el aprendizaje, pero debido a un error técnico el electrodo de estimulación fue insertado en una región distinta del cerebro. Al observar que el animal

parecía disfrutar del paso de la corriente, Olds y Milner modificaron su experimento de forma que la rata podía suministrarse por sí misma la corriente presionando una palanca. Esta autoestimulación era particularmente pronunciada cuando se insertaban los electrodos en determinadas regiones cerebrales (Vetulani, 2001). Mediante esta técnica fue posible trazar un mapa cerebral con las vías implicadas en el refuerzo. El haz prosencefálico medial, que conecta el área tegmental ventral (ATV) con el núcleo accumbens (NAc), fue el primero en ser identificado en este sistema. Otras vías de neurotransmisión que también han sido implicadas en el refuerzo incluyen proyecciones desde el ATV y el NAc, que inervan otras áreas límbicas (como la amígdala) y corticales, importantes en la expresión de las emociones, la reacción ante estímulos condicionados, la planificación y el juicio. Aunque el haz prosencefálico medial está formado por neuronas que contienen dopamina (DA), norepinefrina o noradrenalina (NE), y serotonina (SER, o 5-hidroxitriptamina [5-HT]), es la proyección dopaminérgica la que ha sido fuertemente implicada en el refuerzo (Figura 1). Tanto los refuerzos naturales (la comida, el sexo, las interacciones sociales, entre otros) como los artificiales (drogas de abuso) activan esta vía dopaminérgica (mesolímbica), provocando un incremento en los niveles de dopamina en el NAc (Tomkins y Sellers, 2001).

Muchos datos indican, por tanto, que la vía ATV-NAc y otras regiones límbicas median los efectos emocionales positivos agudos de los refuerzos naturales. Estas mismas regiones han sido implicadas en lo que se conoce como “adicciones naturales” (consumo compulsivo de refuerzos naturales), entre las que encontramos la adicción a la comida, el juego patológico, y las adicciones sexuales (Nestler, 2005).

Todas las drogas de abuso activan el sistema dopaminérgico mesolímbico, pero hay muchos datos que sugieren una recompensa independiente de la dopamina, que ocurre a nivel del NAc (Koob, 1992; Nestler, 2005).

En la adicción, la conducta de consumo de drogas progresa desde la impulsividad a la compulsividad en un ciclo de tres etapas, y ambas pueden coexistir en diferentes etapas de este ciclo (Koob, 2011). A continuación se expondrán de forma resumida los mecanismos neurobiológicos implicados en estas etapas del ciclo de la adicción (Figura 2).

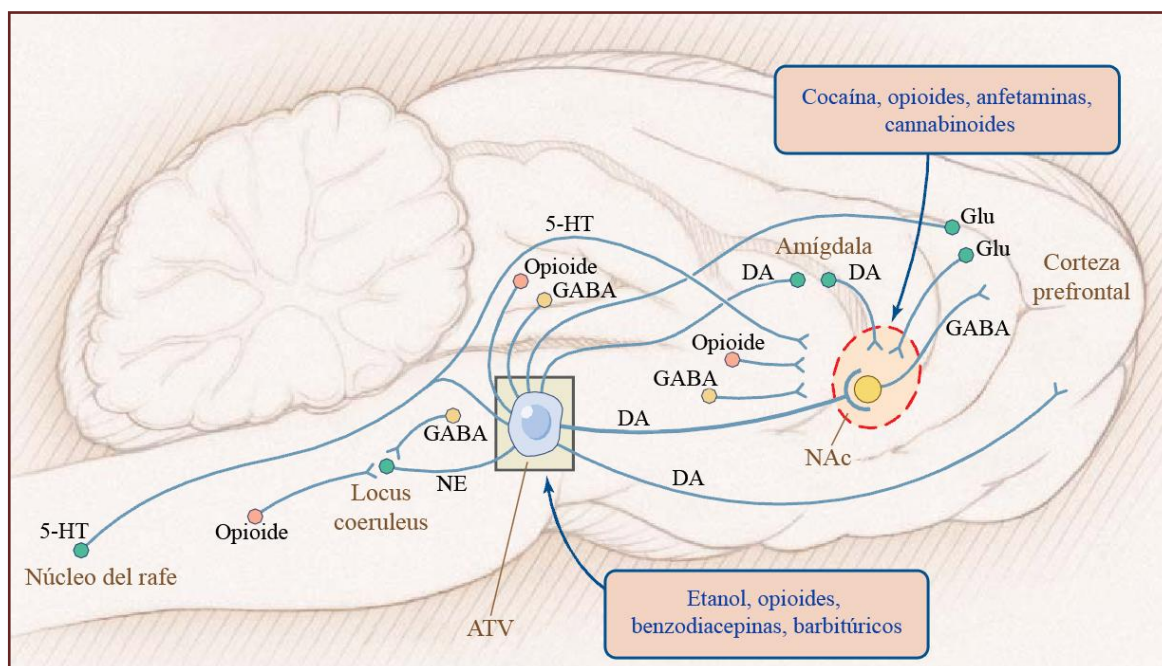


Figura 1. Circuitos de recompensa importantes en los efectos de refuerzo de las drogas de abuso, en el cerebro de la rata. Los sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbicos con origen en el ATV incluyen proyecciones desde los cuerpos neuronales del ATV al NAc, amígdala, y corteza prefrontal (CPF); las proyecciones glutamatérgicas (Glu) desde la CPF al NAc y el ATV; y proyecciones desde las neuronas gabaérgicas (GABA) del NAc a la CPF. Las interneuronas opioides modulan la acción inhibitoria de las neuronas gabaérgicas en el ATV e influyen en la activación de neuronas noradrenérgicas (NE) del locus coeruleus. Las proyecciones serotoninérgicas (5-HT) desde el núcleo del rafe se extienden hasta el ATV y el NAc. La figura muestra los sitios de acción propuestos para varias drogas en estos circuitos (modificada de Camí y Farré, 2003).

Respecto a la etapa de *binge o atracón / intoxicación*, se piensa que la acción inicial del refuerzo de las drogas dependería de la liberación de dopamina en el NAc (en el caso de la cocaína, anfetamina y nicotina), la activación del receptor péptido opioide en el ATV (vía activación dopaminérgica) y NAc (independiente de activación dopaminérgica) para los opiáceos; y los sistemas GABA_A (ácido gamma-aminobutírico de tipo A) en el NAc y la amígdala para el alcohol. El NAc está situado estratégicamente para recibir información límbica (desde la amígdala, la corteza frontal, y el hipocampo) que podría ser convertida en acción motivacional mediante sus conexiones con el sistema motor extrapiramidal (Koob, 2011; Koob y Volkow, 2010).

La amígdala extendida parece estar relacionada con el estado emocional negativo que promueve los mecanismos de refuerzo negativo asociados con el desarrollo de la adicción. La amígdala extendida está compuesta por el núcleo central de la amígdala, el núcleo del lecho de la estría terminal, y una zona de transición en la región medial

(Shell) del NAc. Además, recibe numerosas aferencias desde estructuras límbicas tales como la amígdala basolateral y el hipocampo, y envía eferencias a la parte medial del pálido ventral y una larga proyección al hipotálamo lateral (Koob y Volkow, 2010).

En la etapa de la *abstinencia / afecto negativo* (Figura 2) tienen lugar distintos tipos de cambios. Por una parte, está asociada a cambios intrasistema reflejados en una disminución de la actividad dopaminérgica en la vía mesolímbica y, por otra, con un reclutamiento entre sistemas de neurotransmisión implicados en efectos de estrés y ansiedad tales como el factor liberador de corticotropina (CRF) y la dinorfina. Otros sistemas de neurotransmisión implicados en la desregulación emocional de los efectos motivacionales de la abstinencia a las drogas incluyen norepinefrina, sustancia P, vasopresina, neuropéptido Y (NPY), endocannabinoides, y nociceptina (Koob, 2008).

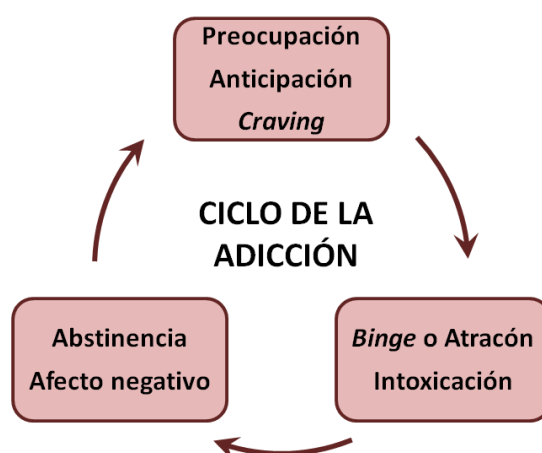


Figura 2. Componentes principales del ciclo de la adicción.

El concepto de sistema de anti-recompensa, o estrés, ha sido formulado para acomodar los cambios significativos en los sistemas emocionales cerebrales asociados con el desarrollo de la dependencia. Se trata de un sistema originalmente encargado de contrarrestar los efectos recompensantes de las drogas y que después pasaría a dominar el balance motivacional del organismo. El reclutamiento de los procesos de anti-recompensa promueve una cascada de reforzamiento negativo que contribuiría al incremento del *craving*. Este concepto se deriva de la hipótesis de las neuroadaptaciones entre sistemas para la activación del sistema de recompensa a nivel de neurocircuitaría. Esta neuroadaptación entre sistemas haría referencia a la activación del circuito de anti-recompensa llevada a cabo por el circuito de recompensa (Koob, 2011).

La etapa de *preocupación / anticipación*, o *craving*, del ciclo de la adicción (Figura 2) parece ser un elemento clave de la recaída en humanos. Los modelos animales de craving pueden ser divididos en: (a) búsqueda de la droga inducida por la droga o estímulos asociados con el consumo de la droga, y (b) búsqueda de la droga inducida por un estresor agudo o un estado emocional negativo residual, a menudo un estado de estrés, llamado abstinencia prolongada (Koob y Volkow, 2010). La etapa de *craving* implica importantes proyecciones aferentes al NAc y la amígdala, específicamente el córtex prefrontal (para el restablecimiento inducido por drogas) y la amígdala basolateral (para el restablecimiento inducido por clave). Se ha planteado que la conducta de búsqueda compulsiva de la droga podría ser mantenida por bucles a nivel estriatal ventral-palidal ventral-talámico-cortical (Koob, 2011).

2. CORTEZA PREFRONTAL Y ADICCIÓN

2.1. Funciones de la corteza prefrontal y sus alteraciones en la adicción

La corteza prefrontal está implicada en el control ejecutivo, la toma de decisiones, el aprendizaje por refuerzos y la valoración (Kravitz et al., 2015), un punto de vista que comparten los estudios realizados en humanos, monos y ratas. También, desde una visión más general, se considera que la CPF es fundamental para el mantenimiento “on-line” de las representaciones de la memoria (Dalley et al., 2004).

La actividad entre las regiones de la CPF está altamente integrada y es flexible, de forma que cualquier región está implicada en múltiples funciones. Sin embargo, y como se comentará más adelante, algunas regiones específicas de la CPF han sido predominantemente implicadas en funciones más concretas (Goldstein y Volkow, 2011). En la Tabla 2 se recogen los principales procesos asociados con la CPF, sus posibles alteraciones en la adicción, así como las regiones específicas de la CPF que estarían implicadas.

En esta misma línea, además, los estudios optogenéticos de la CPF han demostrado que existen circuitos específicos en esta estructura que tienen diferentes roles en la modulación de conductas asociadas con el trastorno por uso de sustancias (Kravitz et al., 2015).

Por otra parte, la corteza prelímbica, que se corresponde con la CPF dorsomedial en humanos, es indispensable para el aprendizaje instrumental y la conducta dirigida a objetivos, y está implicada en la búsqueda de la droga y el restablecimiento del consumo inducidos por la droga o por una señal. Los datos muestran también que la corteza infralímbica (CPF ventromedial en humanos) está involucrada en el aprendizaje estímulo-respuesta y en los hábitos comportamentales (Capriles et al., 2003; Di Ciano et al., 2007; Killcross y Coutureau, 2003; Ostlund y Balleine, 2005).

Los estudios de neuroimagen han puesto de manifiesto un patrón emergente de disfunción generalizada de la CPF en individuos adictos a las drogas, que está asociado con resultados más negativos en cuanto al consumo de drogas, la ejecución de tareas relacionadas con la CPF, y la probabilidad de recaída. En estos sujetos adictos, la activación generalizada de la CPF después de consumir cocaína u otras drogas, y tras la presentación de señales relacionadas con las drogas, se ve reemplazada por una

hipoactividad generalizada de la CPF durante la exposición a pruebas de alto nivel emocional y cognitivo, y/o durante la abstinencia prolongada (Goldstein y Volkow, 2011).

Tabla 2. Procesos asociados con la CPF que son alterados en la adicción

Procesos	Posibles alteraciones en la adicción	Región probable de la CPF
Autocontrol y supervisión del comportamiento: inhibición de la respuesta, coordinación conductual, predicción, detección y resolución de conflicto y error.	Impulsividad, compulsividad, asunción de riesgos y deterioro del autocontrol (habitual, automático, guiado por el estímulo y patrones conductuales inflexibles).	CPFdl, CCAAd, GFI y CPFvl
Regulación de las emociones: supresión cognitiva y afectiva de las emociones.	Reactividad al estrés aumentada e incapacidad para suprimir la intensidad emocional.	COFm, CPFvm y CCA subgenual
Motivación: impulso o "drive", iniciativa, persistencia y esfuerzo hacia la consecución de objetivos.	Motivación aumentada para conseguir las drogas, pero disminuida para otros objetivos, e intencionalidad y esfuerzo comprometidas.	COF, CCA, CPFvm y CPFdl
Conciencia e interocepción: sentir el propio cuerpo y el estado subjetivo, "insight".	Saciedad reducida, negación de enfermedad o necesidad de tratamiento, y pensamiento orientado externamente.	CCAr y CCAAd, CPFm, COF y CPFvl
Atención y flexibilidad: formación y mantenimiento de un set atencional frente al cambio (set-shifting), y cambio de tarea.	Sesgo de atención hacia los estímulos relacionados con las drogas y lejos de otros estímulos y refuerzos, e inflexibilidad en objetivos para conseguir la droga.	CPFdl, CCA, GFI y CPFvl
Memoria de trabajo: memoria a corto plazo que permite la construcción de representaciones y la guía de la acción.	Formación de memoria sesgada hacia estímulos relacionados con las drogas y lejos de alternativas.	CPFdl
Aprendizaje y memoria: aprendizaje asociativo de estímulo-respuesta, aprendizaje de inversión, extinción, devaluación de la recompensa, inhibición latente (supresión de información) y memoria a largo plazo.	condicionamiento a la droga y capacidad alterada para actualizar el valor de la recompensa de refuerzos no relacionados con la droga.	CPFdl, COF y CCA
Toma de decisiones: valoración (codificación de refuerzos) frente a la elección, resultado esperado, estimación de probabilidad, planificación y formación del objetivo.	Anticipación reaccionada con la droga, elección de recompensas inmediatas sobre gratificación retardada, descuento de consecuencias futuras, y predicciones o planificación de la acción inexactas.	COFl, COFm, CPFvm y CPFdl
Atribución de saliencia: valoración del valor afectivo, saliencia del incentivo y utilidad subjetiva (resultados alternativos).	Las drogas y las señales de drogas tienen un valor sensibilizado, los refuerzos no relacionados con la droga son devaluados y los gradientes no son percibidos, y error de predicción negativo (experiencia actual peor que la esperada).	COFm y CPFvm

CPF: corteza prefrontal, CPFdl: CPF dorsolateral, CPFvl: CPF ventrolateral, CPFm: CPF medial, CPFvm: CPF ventromedial. CCA: corteza cingulada anterior, CCAAd: CCA dorsal, CCAr: CCA rostral. COF: corteza orbitofrontal, COFm: COF medial, COFl: COF lateral. GFI: giro frontal inferior.

Modificada de Goldstein y Volkow, 2011

2.2. Organización estructural de la corteza prefrontal en roedores

La CPF muestra una gran variación entre las distintas especies en términos de criterios anatómicos, como es el caso de su citoarquitectura y conectividad. Sin embargo, teniendo en cuenta la definición que hacen Rose y Woolsey de la CPF, como el área cortical que recibe conexiones recíprocas desde el núcleo medial dorsal del tálamo (Rose y Woolsey, 1948), así como otros criterios que incluyen, además, características funcionales (Uylings et al., 2003; Uylings y van Eden, 1990), se pueden identificar

varias regiones distintas en la CPF de la rata. Se podrían distinguir tres zonas generales (ver Figura 3):

- Medial: puede ser subdividida en una región dorsal, que incluye la corteza cingulada anterior (CCA) y la corteza precentral (PrC), y una parte ventral que incluye las cortezas prelímbica (PrL), infralímbica (IL) y orbital medial (OM).
- Lateral: incluye las cortezas insular agranular dorsal (IAD), ventral (IAV), y orbital lateral (OL).
- Ventral: engloba las cortezas orbital ventral (OV) y orbital lateral ventral (OLV).

La CPF recibe proyecciones talamo-corticales, cortico-coticales, y desde estructuras subcorticales tales como la sustancia negra, ATV, amígdala, hipotálamo lateral, e hipocampo. Además, hay conexiones recíprocas desde la CPF a estas estructuras, y proyecciones directas al septum lateral, mesencéfalo, y regiones autonómicas del tronco del encéfalo (Groenewegen et al., 1997; Kolb y Tees, 1990).

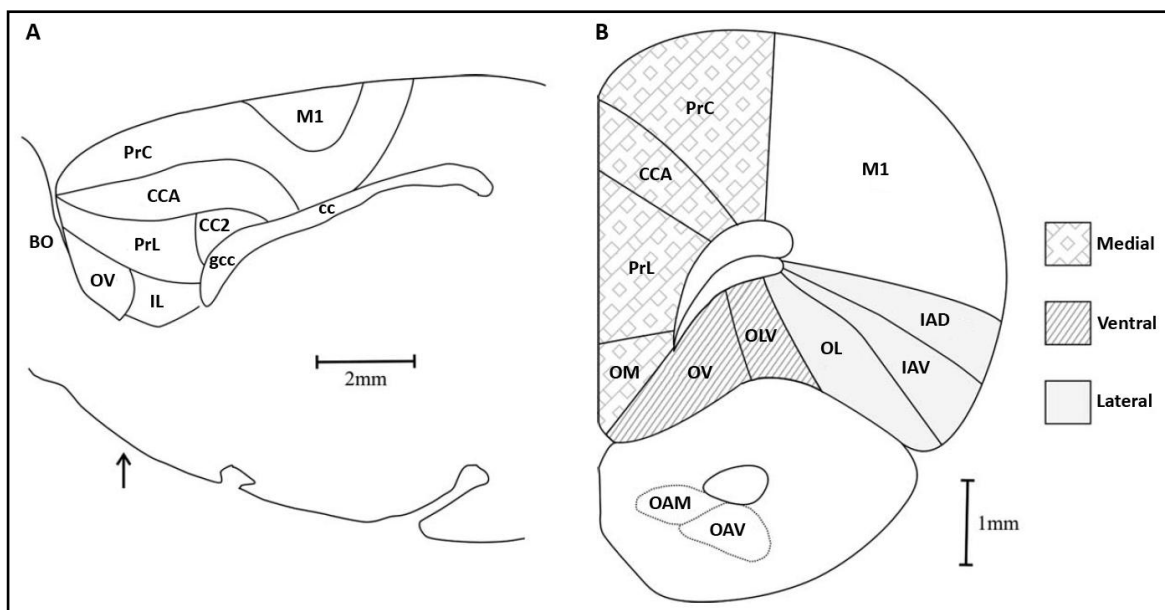


Figura 3. Diagramas de la CPF de la rata. A) Sección sagital, 0.9 mm desde la línea media. B) Sección coronal unilateral, aproximadamente 3.5 mm rostral a bregma (representado por la flecha vertical). Los diferentes sombreados muestran las tres subdivisiones principales de la CPF (medial, ventral, y lateral). IAD e IAV, corteza insular agranular dorsal y ventral; OAM y OAV, núcleo olfatorio anterior medial y ventral; cc, cuerpo calloso; CCA, corteza cingulada anterior; gcc, genu del cuerpo calloso; OM, OL, OLV, y OV, corteza orbital medial, lateral, lateral ventral, y ventral; M1, área motora primaria; PrC y PrL, cortezas precentral y prelímbica; BO, bulbo olfatorio; IL, corteza infralímbica (modificada de Dalley et al., 2004).

3. ALCOHOL

3.1. El alcohol como droga de abuso

El consumo excesivo de alcohol, antes considerado como una conducta pecaminosa, empezó a conceptualizarse como “trastorno” gracias a pioneros como Thomas Trotter y Benjamin Rush, además de Magnus Huss, quien introdujo el término “alcoholismo” en el año 1849 (Tabakoff y Hoffman, 2013).

En la actualidad, según la OMS, el consumo nocivo de alcohol representa una gran carga para las sociedades, tanto en el ámbito de la salud como a nivel económico y social. Además de estar asociado a más de 200 enfermedades y lesiones, principalmente a la dependencia de alcohol, cirrosis hepática y cáncer (Tabla 3), también se sugiere, a partir de distintas investigaciones, una relación causal entre el consumo perjudicial de alcohol y enfermedades infecciosas como la tuberculosis y el VIH / SIDA.

En este sentido, es importante señalar que en el año 2010 el consumo mundial fue de 6.2 litros de alcohol puro, en personas de 15 años o mayores, lo que se traduce en 13.5 gramos de alcohol puro por día. Por otra parte, en el año 2012, aproximadamente 3.3 millones de muertes fueron atribuibles al consumo de alcohol (WHO, 2014).

Las enfermedades relacionadas con el alcohol, especialmente el alcoholismo, son el resultado de las respuestas acumuladas de la exposición al alcohol, la dotación genética de un individuo, y el ambiente al que se encuentra expuesto a lo largo del tiempo. Esta compleja interacción implica una amplia heterogeneidad entre los pacientes dependientes de alcohol, tanto en las dimensiones de los síntomas como en la severidad del trastorno (Spanagel, 2009).

En cuanto al daño cerebral relacionado con el alcohol, está bien establecido que incluso los alcohólicos sin complicaciones, es decir aquellos que no tienen problemas neurológicos o hepáticos específicos, muestran signos de daño cerebral regional y disfunción cognitiva. Algunos de estos cambios son permanentes, mientras que otros son reversibles (Harper, 2009). Los patrones de daño parecen relacionarse con la duración del consumo de alcohol a lo largo de la vida del sujeto, siendo esto último trascendental, además, para las complicaciones médicas asociadas, como es el caso del síndrome de Wernicke-Korsakoff (Harper y Matsumoto, 2005; Zahr et al., 2011).

Tabla 3. Principales problemas de salud relacionados con el consumo de alcohol

Enfermedades infecciosas	Infección por VIH, infecciones de transmisión sexual, tuberculosis, neumonía adquirida en la comunidad.
Cáncer	Cavidad oral, faringe, esófago, colon y recto, hígado, laringe, mama.
Enfermedades metabólicas	Diabetes mellitus tipo 2.
Trastornos mentales	Trastorno por consumo de alcohol (abuso, uso nocivo, dependencia), intoxicación aguda, psicosis (depresión).
Enfermedades neurológicas	Convulsiones, neuropatías.
Enfermedades cardiovasculares	Hipertensión, arritmias, cardiomiopatía, ictus hemorrágico.
Enfermedades gastrointestinales	Cirrosis, pancreatitis, gastritis.
Trastornos maternos y perinatales	Síndrome alcohólico fetal, prematuridad, bajo peso al nacer, embarazo no deseado.
Lesiones no intencionadas	Accidentes de tráfico, laborales, domésticos, caídas, golpes, quemaduras, entre otros.
Lesiones intencionadas	Lesiones autoinflingidas (suicidio), agresiones violentas.

Modificada de Sarasa-Renedo et al., 2014

Los deterioros en la función neurológica que se observan con más frecuencia en la dependencia de alcohol, incluyen déficits en resolución de problemas abstractos, aprendizaje visoespacial y verbal, memoria, habilidades motoras perceptivas, e incluso en la función motora. En este sentido, el patrón de déficits cognitivos se ha considerado principalmente de naturaleza “frontal”, aunque también se ha planteado la posibilidad de la contribución de los sistemas pontocerebelar y cerebelo-tálamo-cortical en el deterioro cognitivo y motor (Harper y Matsumoto, 2005; Moselhy et al., 2001).

El consumo de alcohol también afecta al peso del cerebro, así los sujetos alcohólicos presentan un menor peso de su cerebro en comparación con los no alcohólicos, correlacionándose el grado de atrofia cerebral con la tasa y la cantidad de alcohol consumido durante toda la vida. Esta reducción de peso y de volumen del cerebro puede ser debida a la reducción en el volumen de materia blanca, como apuntan algunos estudios, aunque otros encuentran, además, una disminución significativa de la materia gris cortical (Harper, 2009; Pfefferbaum et al., 1995).

Se ha descrito una pérdida neuronal relacionada con el alcohol en regiones específicas de la corteza cerebral (corteza asociativa frontal superior), hipotálamo, y cerebelo, aunque no se han encontrado cambios ni en los ganglios basales, ni en los núcleos del

rafé serotoninérgicos (Harper, 1998). Por otra parte, se han observado cambios dendríticos y sinápticos en individuos alcohólicos, lo que podría explicar, junto con los cambios en receptores y transmisores, los cambios funcionales y déficits cognitivos que preceden a los cambios estructurales más severos (Harper y Matsumoto, 2005).

3.2. Farmacología del alcohol

El alcohol etílico o etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) es un líquido claro, incoloro, volátil, e inflamable. El aporte energético de un gramo de alcohol al organismo es de 7.1 Kcal, que no se ve acompañado por un aporte nutritivo, como minerales, proteínas o vitaminas. El alcohol se obtiene fundamentalmente de la fermentación anaeróbica de los hidratos de carbono, mediante la fermentación alcohólica (Álvarez-González y Del Río Gracia, 2003). La flora gastrointestinal de los mamíferos produce pequeñas cantidades de etanol, y también ocurre de forma natural en algunos alimentos. Sin embargo, la principal fuente de alcohol en la dieta es la derivada de las bebidas procesadas mediante fermentación alcohólica, tales como cerveza, licores destilados, y vino (Ferreira y Willoughby, 2008). El etanol es una sustancia adictiva poco potente, dado que sus efectos farmacológicos se observan tras la ingesta de gramos de etanol, mientras que en otras sustancias adictivas estos efectos se observan a dosis de miligramos/peso corporal. La estructura química del etanol le permite interaccionar con grupos polares y no polares de componentes de la membrana plasmática, lo que explica su elevada solubilidad tanto en entornos acuosos como en lipídicos. Además, su estructura química explicaría, en parte, la complejidad y multitud de efectos inducidos por dicha sustancia (Guerri, 2000).

Aunque el responsable principal de las acciones es el alcohol, la presencia de otros compuestos en las bebidas alcohólicas puede contribuir al daño cuando se consume en exceso. Entre estos compuestos se encuentran alcoholes de bajo peso molecular (metanol, butanol), aldehídos, ésteres, histamina, fenoles, taninos, hierro, plomo y cobalto (Álvarez-González y Del Río Gracia, 2003).

3.2.1. Farmacocinética

Absorción y Distribución

El alcohol es una molécula pequeña que, como ya se ha dicho, presenta características tanto hidrofílicas como lipofílicas. Es rápidamente absorbido en el estómago (20%) e

intestinos (80%) mediante difusión simple (Marek y Kraft, 2014; Norberg et al., 2003). La absorción del alcohol desde el duodeno y el yeyuno es más rápida que desde el estómago, por lo que la tasa de vaciado gástrico es un determinante importante en la tasa de absorción del alcohol administrado oralmente.

Entre los factores que afectan a la absorción del alcohol se encuentran: 1) La concentración: a mayor concentración de alcohol, mayor es el gradiente de concentración resultante, y por tanto más rápida la absorción por difusión pasiva. 2) Flujo de sangre en el lugar de absorción: la rápida eliminación de esta sustancia del lugar de absorción mediante un eficiente flujo sanguíneo ayudará al mantenimiento del gradiente de concentración, promoviendo así la absorción. 3) Las propiedades irritantes: altas concentraciones de alcohol pueden causar erosiones superficiales, hemorragias y parálisis de la musculatura lisa del estómago, que reducirían su absorción. 4) Tasa de consumo: el pico de los niveles de alcohol en sangre es más alto si este se ingiere en una única dosis en lugar de en varias dosis más pequeñas. 5) Tipo de bebida: en general, hay poca diferencia en la tasa de absorción de la misma dosis de alcohol administrada en forma de distintos tipos de bebidas alcohólicas. 6) Alimentos: la presencia de comida en el estómago retrasa el vaciado gástrico y por tanto reducirá la absorción de alcohol. Los alimentos con alto contenido en grasas, carbohidratos, o proteínas son igual de eficaces en el retraso del vaciado gástrico (Cederbaum, 2012).

Tras la absorción, el alcohol se distribuye fácilmente a los tejidos y fluidos corporales, sin mostrar ninguna unión a proteínas. El volumen de distribución del mismo está determinado principalmente por el contenido de agua corporal, el cual es parcialmente responsable de las diferencias en parámetros farmacocinéticos relacionadas con la edad y el sexo. Factores como el tamaño del sujeto y el porcentaje de grasa corporal (relacionado con la obesidad, el sexo y la edad), también determinan la velocidad de distribución (Norberg et al., 2003). El alcohol atraviesa las barreras hematoencefálica y placentaria, presentando una cinética de dos compartimentos, en la que la tasa de distribución depende de elementos que regulan la circulación periférica, incluyendo vasoconstricción, cambios hormonales, actividad muscular, temperatura, y deficiencias en el sistema circulatorio (Marek y Kraft, 2014; Norberg et al., 2003).

Metabolismo y Eliminación

La mayor parte del alcohol ingerido es metabolizado a acetaldehído en el hígado mediante uno de los siguientes sistemas: 1) Alcohol Deshidrogenasa (ADH), 2) Sistema Microsomal de Oxidación del Etanol (MEOS), o 3) Catalasa de los peroxisomas. Posteriormente, el acetaldehído es oxidado a acetato gracias a la Aldehído Deshidrogenasa (ALDH). El acetato abandona el hígado y es convertido a acetil-coenzima A (Acetil-CoA), la cual es metabolizada en la mitocondria produciendo finalmente dióxido de carbono y agua (ver Figura 4). Una pequeña fracción del alcohol es eliminada mediante vías no oxidativas, e implican la conjugación del etanol a sustratos endógenos tales como ácidos grasos, fosfolípidos, sulfato, o ácido glucurónico. Menos del 10% del alcohol es eliminado por la respiración, el sudor, y la orina (Cederbaum, 2012; Marek y Kraft, 2014; Sanchis Fortea et al., 1999). Una persona de 70 kg de peso puede metabolizar, aproximadamente, entre 170 y 240 gramos de alcohol en un día (Cederbaum, 2012).

La ADH representa la mayor parte del metabolismo oxidativo del alcohol. Se trata de una enzima con una amplia especificidad de sustrato, oxidando muchos alcoholes primarios y secundarios. La ADH está localizada en la fracción citosólica de la célula, y se encuentra en grandes cantidades en el hígado, seguido por el tracto gastrointestinal, riñones, mucosa nasal, testículos y útero (Cederbaum, 2012). Los humanos tienen 5 clases principales de enzimas ADH (Clase I-V), con diferentes afinidades por el alcohol. La Clase I se encuentra principalmente en el hígado y es la que más contribuye al metabolismo del alcohol. La ADH Clase II también está localizada en el hígado y contribuye al metabolismo de altas concentraciones de alcohol. La Clase III está distribuida por todo el cuerpo, mientras que la Clase IV se encuentra localizada en el tracto digestivo y estómago. La ADH Clase V solamente ha sido reconocida a nivel de ARNm en el hígado y en el estómago (Cederbaum, 2012; Crabb et al., 2004; Marek y Kraft, 2014).

En la Figura 4 se muestran las principales rutas de la oxidación del alcohol. Como se puede observar, tanto la ADH como la ALDH transfieren el hidrógeno a un aceptor Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD^+), que se convierte en la forma reducida (NADH).

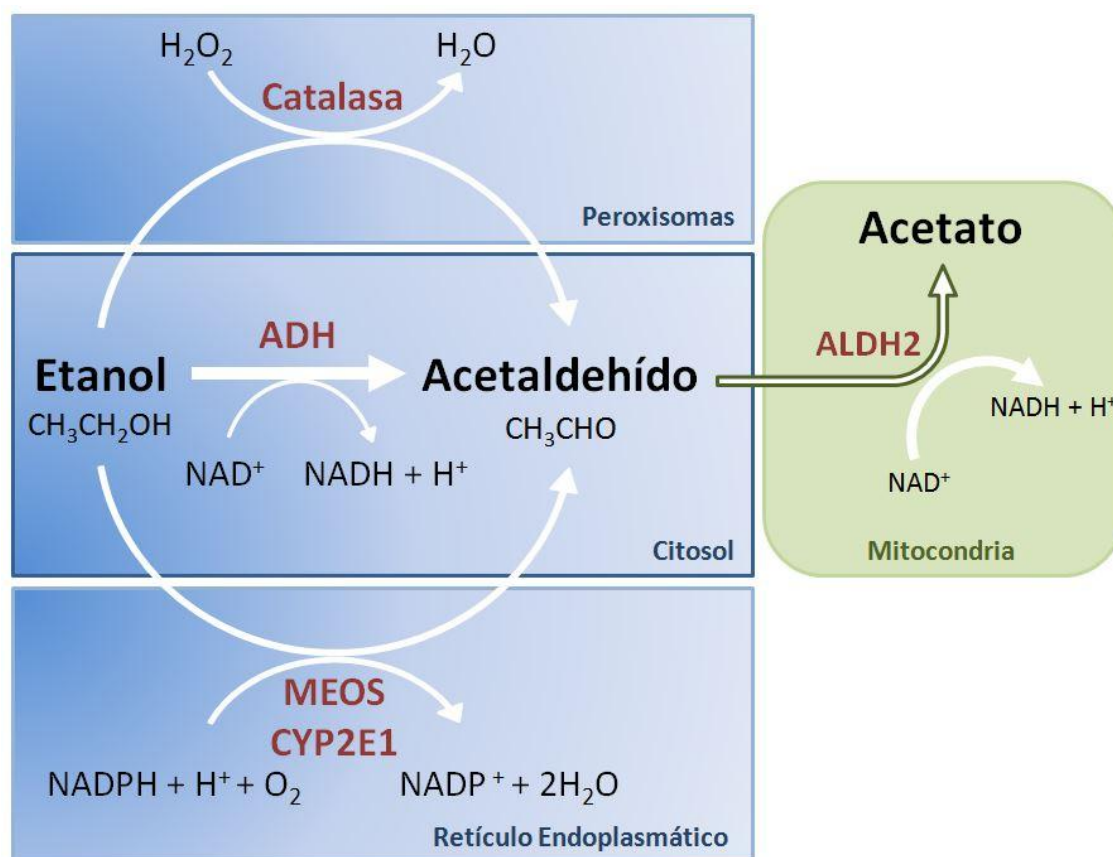


Figura 4. Vías metabólicas de oxidación del etanol (modificada de Sanchis Fortea et al., 1999; Zakhari, 2013).

El MEOS es un sistema dependiente de citocromo P450, que implica los citocromos P4502E1 (CYP2E1), P4501A2 (CYP1A2), y P4503A4 (CYP3A4) (Lieber, 1999). Este sistema representa <10% de la oxidación hepática del alcohol, teniendo CYP2E1 el papel principal en este metabolismo, y siendo particularmente importante a altas concentraciones de alcohol (Lieber, 1999; Matsumoto y Fukui, 2002). CYP2E1 ha sido vinculado a la hepatotoxicidad inducida por alcohol. Además, la administración crónica de alcohol incrementa los niveles de este citocromo (Matsumoto y Fukui, 2002; Tsutsumi et al., 1989).

La catalasa, una enzima antioxidante, degrada el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Figura 4). Utilizando el peróxido de hidrógeno, esta enzima puede oxidar una amplia variedad de compuestos, incluyendo el alcohol. La vía de la catalasa supone, aproximadamente, un 2% del metabolismo del alcohol, y juega un importante papel en la producción de acetaldehído en el cerebro (Cederbaum, 2012; Hunt, 1996; Zimatkin et al., 2006).

Las enzimas ALDH oxidan irreversiblemente el acetaldehído en acetato, de una manera dependiente de $\text{NAD}^+(\text{P})$ (nicotinamida adenina dinucleótido [fosfato]). Han sido identificadas 19 isoenzimas ALDH humanas, siendo la ALDH1A1 citosólica y la ALDH2 mitocondrial las más importantes para el metabolismo del acetaldehído. Estas dos isoenzimas están distribuidas por el cuerpo, incluyendo el hígado, riñón y cerebro (Marchitti et al., 2008).

El acetato resultante de estas reacciones es metabolizado en otros tejidos, y en el hígado, a Acetil-CoA, que seguirá sus propias rutas metabólicas (Sanchis Fortea et al., 1999).

3.2.2. Farmacodinamia

En los últimos años ha tenido lugar un cambio relacionado con las teorías postuladas para explicar cómo el alcohol afecta al sistema nervioso central (SNC). Inicialmente se defendía que las principales dianas del alcohol son los lípidos de membrana (teoría de los lípidos), y posteriormente la atención se centró en las proteínas de membrana (teoría de las proteínas), especialmente en los receptores. Aunque ambas teorías difieren en el sitio principal de acción, las dos postulan que los efectos del alcohol sobre el SNC son, en última instancia, resultado de alteraciones en la función de las proteínas (Peoples et al., 1996; Spanagel, 2009). Varios estudios demuestran las limitaciones de la hipótesis de lípidos, considerándose, actualmente, que la participación de este mecanismo sería a través de la interacción del alcohol a bajas concentraciones con microdominios específicos de la membrana, modificando y modulando ciertas interacciones proteína-membrana y proteína-ligando (Guerri, 2000; Peoples et al., 1996). La principal razón para un cambio hacia la teoría de las proteínas está en los hallazgos que mostraron que el alcohol, a concentraciones en el rango 10-20 mM, interfiere directamente con la función de varios canales iónicos y receptores (Spanagel, 2009).

A pesar de la opinión generalizada de que el alcohol es un agente farmacológico inespecífico, estudios recientes demuestran que el alcohol tiene pocas dianas principales, estas incluyen los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), GABA_A , 5-HT_3 (5-hidroxitriptamina de tipo 3), y nAChRs (receptores nicotínicos de acetilcolina), así como los canales de Ca^{2+} de tipo L y canales GIRKs (canales de potasio de rectificación interna acoplados a proteínas G). Concentraciones de alcohol tan bajas como 1 mM producen alteraciones en la función de estos receptores y canales iónicos (Spanagel, 2009; Vengeliene et al., 2008).

El alcohol lleva a cabo la mayor parte de sus acciones interactuando con los receptores GABA_A y NMDA. De forma que potencia la acción del GABA (neurotransmisor inhibitor por excelencia del SNC) y antagoniza la acción del glutamato (neurotransmisor excitador por excelencia del SNC, junto con el aspartato), lo que hace que las acciones del alcohol sean propiamente las de un depresor del SNC (Ayesta, 2002).

El receptor GABA_A, también denominado complejo receptor GABA_A-ionóforo Cl⁻, es una proteína formada por cinco subunidades (de las familias α , β , γ , δ , y ρ) ensambladas de manera que dejan un canal en su interior, atravesando la membrana neuronal. Tras la activación del receptor, se produce la apertura del canal, permitiendo la entrada de moléculas cargadas negativamente y de pequeño tamaño (especialmente Cl⁻). De esta forma se hiperpolariza la membrana, lo que supone una disminución de la excitabilidad de la neurona y de su actividad funcional. El receptor GABA_A posee sitios de fijación específicos, como por ejemplo los sitios para el GABA, las benzodiazepinas, y los barbitúricos. El etanol no actúa directamente en estos mismos sitios de unión, pero potencia las acciones de los compuestos que actúan en cualquiera de ellos. Paralelamente, los antagonistas de estos compuestos tienden a antagonizar la acción del etanol. Además, al igual que ocurre con los barbitúricos, a dosis fisiológicas, el alcohol no actúa directamente sobre el canal, pero sí lo hace a dosis altas (>250 mg/dl) (Ayesta, 2002; Diamond y Gordon, 1997).

El receptor NMDA es uno de los principales receptores del glutamato, y se encuentra acoplado a un canal catiónico. Su activación produce un aumento en la permeabilidad de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺, lo que conlleva una despolarización de la membrana neuronal. La acción aguda del alcohol en este receptor produce una disminución del flujo de Ca²⁺ a través del canal (Ayesta, 2002; Wirkner et al., 1999). Diversas enzimas celulares se activan gracias al incremento de Ca²⁺ intracelular, ocasionando cambios prolongados en la función neuronal, especialmente en la función sináptica. De esta forma, por ejemplo, el receptor NMDA es responsable de los fenómenos de potenciación a largo plazo (long-term potentiation, LTP), participando en los procesos de aprendizaje y memoria. Además, se sabe que un flujo intracelular excesivo de calcio es neurotóxico (Ayesta, 2002). Por otra parte, la función del NMDA es inhibida por el alcohol de una manera dependiente de la concentración, en el rango de 5 a 50 mM, y la potencia de varios alcoholes para la inhibición de la corriente activada por NMDA está linealmente

relacionada con su potencia de intoxicación. Esta inhibición puede contribuir a las alteraciones neurales y cognitivas asociadas con la intoxicación (Lovinger et al., 1989).

El alcohol afecta directamente, también, a los receptores de glicina, de forma que actúa sobre residuos específicos en los dominios transmembrana, así como en el dominio extracelular de los receptores. El efecto neto sobre la función del receptor sería la suma de los efectos moduladores, positivos y negativos, del alcohol sobre los diferentes sitios de unión sensibles al mismo (Crawford et al., 2007). Además, el alcohol potencia la función de los receptores neuronales nACh y 5-HT₃ (Spanagel, 2009).

Las acciones del alcohol sobre estos canales iónicos y receptores dependen de distintas variables, especialmente de la concentración de alcohol y las subunidades que componen al receptor o canal. Por ejemplo, los datos sugieren que los receptores GABA_A extrasinápticos que contienen la subunidad δ son dianas primarias del alcohol, incluso a muy bajas concentraciones (1-3 mM), mientras que los receptores compuestos por otras subunidades responden sólo a altas concentraciones de alcohol (>60 mM). Por otra parte, los receptores de glicina que contienen $\alpha 1$ parecen ser más sensibles a bajas concentraciones de alcohol, con respecto a los que contienen $\alpha 2$. En el caso de los nAChRs, los subtipos $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 2\beta 2$, y $\alpha 4\beta 2$ son potenciados por concentraciones de alcohol más bajas que 100 mM, mientras que los subtipos $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ no se ven afectados a estas concentraciones y la función del receptor $\alpha 7$ es inhibida. Altas concentraciones de alcohol potencian casi todos los nAChRs. Por otra parte, los receptores NMDA compuestos por las combinaciones NR1/NR2A y, sobre todo, NR1/NR2B son más sensibles a la inhibición por alcohol (Spanagel, 2009; Vengeliene et al., 2008).

La exposición crónica al alcohol produce alteraciones en el funcionamiento cerebral debidas a la desregulación de distintos mecanismos moleculares. Por ejemplo, se da una disminución en la densidad y la función del receptor GABA_A cerebral, además de un incremento o disminución en la expresión genética de las subunidades α y β , dependiendo de la región cerebral (Ayesta, 2002; Golovko et al., 2002). El consumo crónico de alcohol también da lugar a un aumento en el número de receptores NMDA, su afinidad y su función (Ayesta, 2002; Faingold et al., 1998). Por otra parte, se observa un incremento en el número de canales de calcio, sobre todo de tipo L, resultando en un mayor flujo intracelular de calcio voltaje-dependiente, efecto que parece estar mediado por proteína-kinasa C (Ayesta, 2002).

Seguidamente a la acción del alcohol sobre sus dianas principales, tiene lugar una segunda oleada de efectos indirectos sobre una variedad de sistemas neurotransmisor/neuropéptido, donde se ven implicados, principalmente, monoaminas, opioides, y endocannabinoides. Lo que se piensa que es crucial para el inicio del refuerzo y la recompensa producidos por el alcohol (Spanagel, 2009).

El alcohol, al igual que otras drogas, produce un aumento de la actividad dopaminérgica mesolímbica, especialmente en el *shell* del NAc (Di Chiara e Imperato, 1988; Pontieri et al., 1995). El alcohol parece actuar en el ATV, atenuando el tono inhibitorio que ejercen las interneuronas GABAérgicas, lo que incrementaría de forma indirecta la frecuencia de descarga de las neuronas dopaminérgicas. Además, el sistema opioide parece modular la liberación de DA inducida por el alcohol, de manera que la estimulación de los receptores opioides en el ATV aumentaría la frecuencia de descarga de las neuronas dopaminérgicas. El alcohol podría aumentar la transmisión dopaminérgica mediante la estimulación del sistema opioide endógeno. Estos y otros datos apoyan la hipótesis de la participación del sistema opioide en las propiedades de refuerzo del alcohol (Guerri, 2000). La vía mesolímbica dopaminérgica también es controlada por la actividad glutamatérgica, y a su vez, el alcohol a dosis bajas puede elevar los niveles extracelulares de glutamato en el NAc, mientras que a dosis altas reduciría la liberación de este neurotransmisor (Gass y Olive, 2008; Moghaddam y Bolinao, 1994).

Por otra parte, los receptores neuronales nACh y los receptores de glicina también son dianas principales del alcohol y modulan la liberación de DA. Además, hay otros sistemas que modulan la actividad dopaminérgica mesolímbica, entre los que se encuentran el sistema 5-HT del núcleo dorsal del rafe y el sistema endocannabinoide, pudiendo influir, de esta forma, en las propiedades de recompensa del alcohol (Maldonado et al., 2006; Spanagel, 2009).

4. COCAÍNA

4.1. La cocaína como droga de abuso

La cocaína es una sustancia natural que se encuentra en la planta *Erythroxylum coca*, siendo sus hojas las que producen las mayores cantidades de cocaína, aproximadamente el 1% en peso (Goldstein et al., 2009). El uso de la cocaína para la gratificación personal data del año 600 d.C. Los indígenas peruanos han masticado las hojas de coca durante siglos, debido a las propiedades euforizantes de la cocaína y a su capacidad para reducir la fatiga, el hambre, y aumentar la resistencia física (Boghdadi and Henning, 1997).

La cocaína es un agente anestésico local vasoconstrictor, propiedades que son beneficiosas en la cirugía de oído, nariz y garganta. El uso medicinal de la cocaína ha disminuido desde su apogeo (1880-1900), cuando el incremento en la producción de cocaína refinada condujo a un aumento en los informes médicos de toxicidad y mortalidad asociadas a dicha sustancia. La cocaína resurgió como droga de abuso en las décadas de 1970 y 1980, lo que resultó, de nuevo, en un incremento de la incidencia de patologías relacionadas con la cocaína, que fue exacerbado por la introducción del crack de cocaína (White y Lambe, 2003). En la Tabla 4 aparece un resumen con los principales efectos fisiopatológicos relacionados con el abuso de cocaína, incluyendo la patología relacionada con el estilo de vida durante el abuso de la droga, la producida por la intoxicación con la droga (pero no debida directamente a ella), la relacionada con la administración de la cocaína, y la patología resultante de la acción farmacológica de la misma.

En cuanto a los datos epidemiológicos, el consumo de cocaína a nivel mundial se mantuvo estable durante el año 2012 (entre 14 y 21 millones de consumidores), permaneciendo alto en América del Norte y del Sur (con una tasa de prevalencia anual del 1.8% y 1.2%, respectivamente), Oceanía (1.5%) y Europa Occidental y Central (1%) (World Drug Report, UNODC, 2014). En Europa, se trata de la droga estimulante ilegal más consumida, con una estimación de consumo, en el año 2013, de unos 2.2 millones de adultos, de entre 15 y 34 años (Informe Europeo sobre Drogas, OEDT, 2014).

Según el informe nacional en España, en el año 2012, el 3.6% de los estudiantes consultados admitieron haber consumido cocaína (polvo o base), al menos alguna vez

en su vida. En este mismo año, la diferencia entre sexos aumentó, con respecto al año 2010, debido al descenso en el consumo por parte de las mujeres. La edad media de inicio, también respecto a 2010, ha pasado de 14.9 años a 15.5. La forma más prevalente de consumo de esta sustancia continúa siendo la cocaína en polvo (Informe Nacional, OEDT, 2013).

Tabla 4. Efectos fisiopatológicos relacionados con el abuso de la cocaína

Estilo de vida		
Mala alimentación	Abuso de drogas intravenoso	Criminalidad
Intoxicación		
Muerte accidental	Homicidio	Suicidio
Vía de administración		
<i>Inhalada</i>	Quemaduras térmicas/químicas, Pérdida del tabique nasal	
<i>Intravenosa</i>	Endocarditis infecciosa, VIH, Hepatitis, Sobredosis aguda	
Efectos farmacológicos		
<i>Cardiovasculares</i>	Incremento de presión sanguínea y tasa cardíaca, Isquemia miocárdica/Infarto, Dolor en el pecho, Trombosis coronaria, Disritmia, Miocarditis, Disección aórtica	
<i>Respiratorios</i>	Neumotórax, Neumomediastino, Infiltrados alveolares/intersticiales, Edema pulmonar, Infarto pulmonar, Hemorragia pulmonar	
<i>Gastrointestinales</i>	Gastritis/Colitis isquémica, Ulceración, Infarto, Hepatotoxicidad	
<i>Cerebrovasculares</i>	Hemorragia intracerebral, Infarto intracerebral, Vasculitis	
<i>Neurológicas</i>	Hipertermia, Convulsiones	
<i>Psicológicas</i>	Euforia, Adicción y Abstinencia, Depresión + Fatiga (a largo plazo), Psicosis, Esquizofrenia	
<i>Renales</i>	Rabdomiolisis/Mioglobinuria, Insuficiencia renal aguda, Infarto renal	
<i>Maternales</i>	Aborto, Desprendimiento de placenta, Prematuridad, Paro cardíaco perinatal/Convulsiones	
<i>Fetales</i>	Restricción del crecimiento intrauterino, Muerte intrauterina, Microcefalia, Déficit neuroconductual	
Efectos idiosincrásicos		
Delirio agitado	Síndrome de Body packer	
Asociaciones médico-legales		
<i>Antes del Arresto</i>	Suicidio/homicidio, Muerte súbita, Robo, Prostitución, Violencia	
<i>Durante el Arresto</i>	Agresión, Delirio agitado	
<i>Después del Arresto</i>	Delirio agitado, Problemas con el consentimiento, Intoxicación/ Abstinencia, Estado físico/entrevista/defensa, Muerte bajo custodia	

Modificado de White y Lambe, 2003.

4.2. Farmacología de la cocaína

La cocaína, o benzoilmetilecgonina, es un alcaloide extraído del arbusto *E. coca*. Para extraer la cocaína de la planta, las hojas cosechadas se empapan con disolventes como el queroseno para obtener la “pasta de cocaína”. Esta pasta contiene entre un 40-80% de cocaína, y es tratada con ácido clorhídrico para formar el clorhidrato de cocaína (o “cocaína en polvo”), que es la sal de la cocaína (Goldstein et al., 2009). Esta sal es soluble en agua, pero se descompone al calentarla, con un punto de fusión de 195°C. Al ser soluble en agua, la droga puede ser absorbida a través de la mucosa nasal o inyectada por vía intravenosa. Sin embargo, el alcaloide de cocaína, llamado también cocaína base o crack, es una sustancia cristalina, incolora e inodora, insoluble en agua, pero soluble en alcohol, acetona, o éter. Calentando la cocaína base se convierte en un vapor estable que puede ser inhalado (Boghdadi y Henning, 1997).

Aunque la cocaína base y el crack comparten la misma forma química, se diferencian por sus características físicas y técnicas de preparación. Para obtener cocaína base, el polvo del clorhidrato de cocaína es disuelto en agua y se le añade una base, como el amoníaco, y posteriormente el éter como disolvente. La base de cocaína es extraída de la solución éter mediante evaporación. Después de la extracción, éter altamente volátil puede permanecer con la cocaína, lo que puede conllevar un mayor riesgo de quemaduras por éter (principalmente faciales y traqueales) en las personas que fuman la cocaína base. En la actualidad, el uso de la base de cocaína ha disminuido debido a la popularidad del crack. Este último se obtiene disolviendo el clorhidrato de cocaína en agua, mezclando con bicarbonato de sodio y calentando. La cocaína base precipita en una masa blanda que se endurece al secarse. El crack puede ser fumando, pero sin el riesgo inflamable del éter (Boghdadi y Henning, 1997; Goldstein et al., 2009).

4.2.1. Farmacocinética

Absorción y Distribución

La cocaína, de forma general, es rápidamente absorbida por todas las rutas de administración, con excepción de la ingesta oral y aplicación tópica. En estas últimas se produce un retraso en el pico de concentración plasmática debido a la vasoconstricción que genera la vía tópica, y al tiempo necesario para alcanzar el estómago o duodeno en el caso de la oral. La biodisponibilidad de la cocaína varía dependiendo de la ruta de administración, de forma que por vía intravenosa y fumada puede ser mayor al 90%,

mientras que la droga insuflada es biodisponible en un 80% aproximadamente (Goldstein et al., 2009). En la Tabla 5 se muestra el inicio, el pico, y la duración de la acción de la cocaína dependiendo de la vía de administración (Leikin y Paloucek, 2008).

Tabla 5.

Vía	Inicio (minutos, segundos)	Pico (minutos)	Duración (minutos)
Tópica	Dentro de los 5 min	-	-
Intranasal	Dentro de los 5 min	15-20	60-90
Intravenosa	10-60 s	3-5	20-60
Inhalatoria	3-5 s	1-3	5-15

La cocaína se distribuye rápidamente después de la absorción, siendo su unión a proteínas aproximadamente del 90%, y su volumen de distribución 1.96-2.7 L/kg (Leikin y Paloucek, 2008).

Metabolismo y Eliminación

La cocaína es metabolizada a través de distintas vías enzimáticas. Las tres vías principales aparecen en la Figura 5, y son las siguientes:

- La mitad de la dosis absorbida, aproximadamente, es hidrolizada mediante carboxilesterasa, en el hígado humano, para formar benzoilecgonina (BE), el principal metabolito siguiendo todas las vías de administración. La BE puede ser cuantificada en orina después de 1-4 horas, pudiendo mantenerse hasta 144 horas. Su vida media es de 5-6 horas, aproximadamente. Este metabolito tiene propiedades vasoconstrictoras, y no parece atravesar la barrera hematoencefálica con facilidad.
- La *N*-desmetilación hepática de la cocaína forma norcocaína, lo que no representa más del 5% de la droga absorbida. Este metabolito cruza la barrera hematoencefálica y puede producir efectos clínicos similares al compuesto de origen. La norcocaína puede ser metabolizada a *N*-hidroxinorcocaína y norcocaína nitróxido.
- Las colinesterasas plasmáticas (butirilcolinesterasas) reaccionan con la cocaína para formar ecgonina metil ester (EME). Entre un 30% y un 50% de la cocaína es metabolizada a EME, siendo su vida media de unas 5-6 horas. Este metabolito

cruza de manera deficiente la barrera hematoencefálica, y parece poseer poca actividad farmacológica.

Se han identificado otros metabolitos menores de la cocaína, entre los que se encuentran la *p*-hidroxicocaína, *m*-hidroxicocaína, *p*-hidroxibenzoilecgonina, *m*-hidroxibenzoilecgonina, y norbenzoilecgonina. Cuando la cocaína es fumada, se piroliza a varios compuestos químicos dependiendo de la temperatura. El principal metabolito es la anhidroecgonina metil ester (AEME), llamada también metil ecgonidina (Goldstein et al., 2009; Lizasoain et al., 2002).

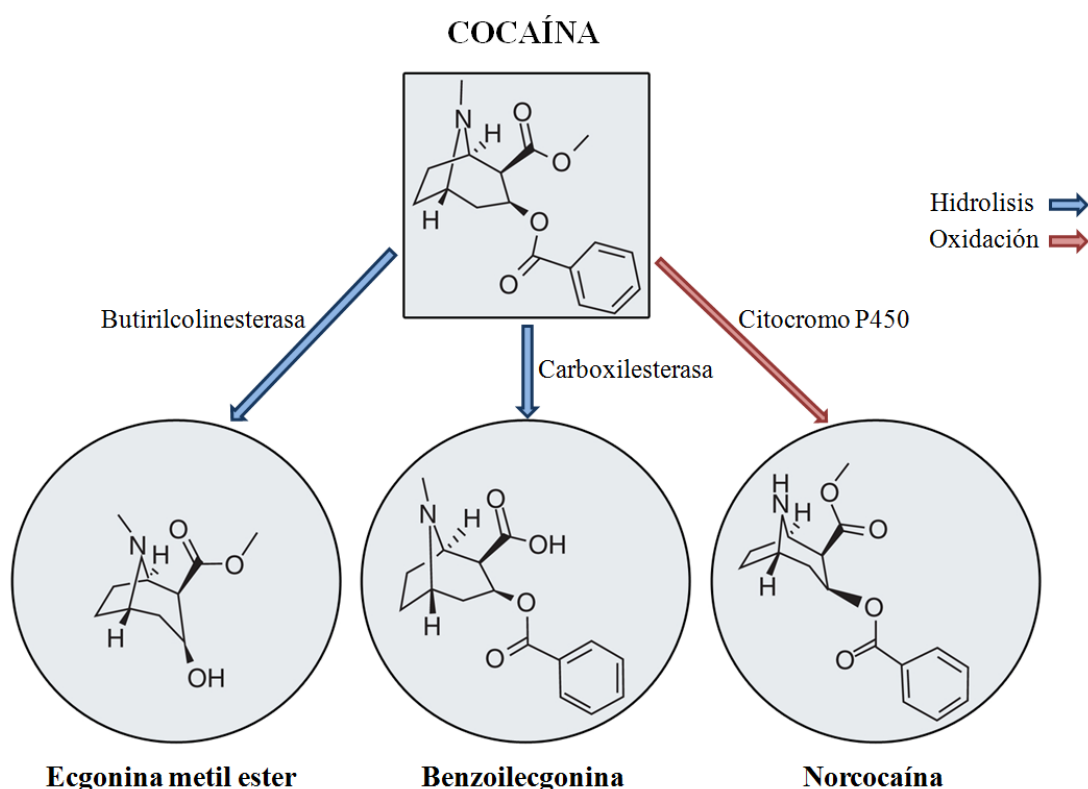


Figura 5. Vías para el metabolismo de la cocaína (modificada de Cascales et al., 1997; Schindler y Goldberg, 2012).

El aclaramiento de la cocaína varía entre 20 y 30 mL/min/kg, y su semivida plasmática es de 1 a 1.5 horas (Lizasoain et al., 2002). Menos del 10% de la cocaína es eliminada en la orina sin metabolizar (Leikin y Paloucek, 2008), y puede ser detectada en orina hasta unas 24-36 horas después de su consumo. Los dos metabolitos principales de la cocaína excretados en orina son la BE y la EME. Estos dos metabolitos, que serán metabolizados a ecgonina, representan el 80-90% de los metabolitos urinarios en humanos. Del 1% al 3% de los metabolitos urinarios son la ecgonina,

norbenzoilecgonina, y norecgonina, que son productos de la *N*-desmetilación. La excreción fecal representa una ruta menor de eliminación de la cocaína y sus metabolitos (Goldstein et al., 2009).

4.2.2. Farmacodinamia

Las propiedades farmacodinámicas de la cocaína son complejas. Esta sustancia bloquea la actividad de los transportadores de DA, NE, y SER (ver Figura 6), dando como resultado final el aumento de los niveles extracelulares de estos neurotransmisores (Pierce y Kumaresan, 2006).

El transportador de DA (DAT) es el encargado de la recaptura y reciclaje de la DA. La unión de la cocaína al DAT se realiza en un sitio distinto a la DA, inhibiendo la unión y el transporte de esta última, y de sodio, al interior del citosol (Povlock y Schenk, 1997; Seiden et al., 1993). La cocaína se une a los transportadores de SER (SERTs) con una potencia cinco veces más elevada, aproximadamente, que a los DATs, y se une a los transportadores de NE (NETs) con una afinidad unas tres veces más baja que a los DATs. Esta diferente afinidad relativa de la cocaína por los transportadores, podría dar lugar a los distintos aspectos de las respuestas conductuales observadas después de su administración, tanto aguda como crónica (White y Kalivas, 1998).

En los últimos años se ha relacionado al DAT tanto con las acciones conductuales como con las acciones bioquímicas de la cocaína (Lizasoain et al., 2002), lo que incluiría sus acciones reforzantes. Sin embargo, los ratones carentes del DAT (ratones *Knockout*) son capaces de autoadministrarse cocaína, lo que se atribuye a la incrementada transmisión dopaminérgica en el NAc que produce la cocaína en estos ratones. Aunque queda por determinar cuáles son las adaptaciones neuronales que permiten este incremento de DA, existen varias hipótesis convincentes que implican, por ejemplo, a los NETs y los SERTs (para revisión ver Gainetdinov y Caron, 2003; Pierce y Kumaresan, 2006). Los datos sugieren, por tanto, que este aumento en la transmisión dopaminérgica contribuye de forma significativa a los efectos reforzantes de los psicoestimulantes. De manera similar, se ha observado el papel crítico que juegan las familias de receptores dopaminérgicos, D1-like (D1 y D5) y D2-like (D2, D3 y D4), en estos efectos reforzantes (Pierce y Kumaresan, 2006).

El exceso de actividad dopaminérgica podría ser el causante de la mayoría de los síntomas del SNC, tanto de los efectos “deseados” como de los tóxicos. Estos síntomas

incluyen euforia, aumento de la autoconfianza y del estado de alerta a dosis bajas, y agresividad, desorientación, y alucinaciones a dosis altas (Goldstein et al., 2009). El consumo crónico de cocaína también produce cambios en la disponibilidad de DA, de forma que la disminución de las reservas de este neurotransmisor puede producir un *craving* intenso y lo que se conoce como síndrome “washed-out” (letargo, anhedonia, y dificultades con los movimientos musculares) (Goldstein et al., 2009; Lizasoain et al., 2002).

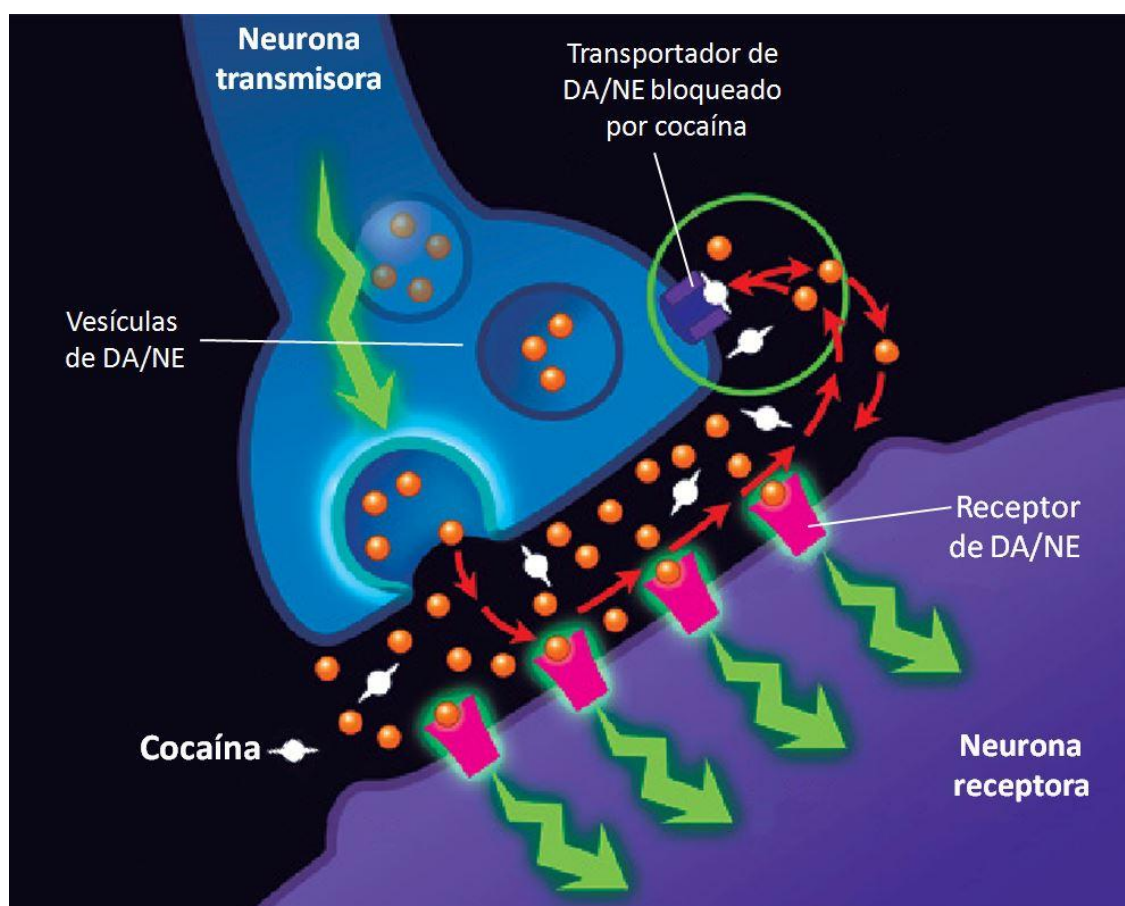


Figura 6. Mecanismo de acción de la cocaína (modificada de Lizasoain et al., 2002; Volkow, 2010).

El incremento de NE producido por la cocaína (Figura 6), es el responsable de la mayoría de los efectos farmacológicos y de las complicaciones agudas de la cocaína, tales como la dilatación pupilar, la sudoración, el aumento de la presión arterial, y el temblor (Lizasoain et al., 2002). Por otra parte, Spealman (1995) sugiere, a partir de su estudio con cocaína en monos, que podría haber una influencia noradrenérgica facilitadora sobre la actividad dopaminérgica mesocorticolímbica. Sin embargo, la NE

no contribuye de forma significativa a los efectos reforzantes de esta droga (Mello et al., 1990; Woolverton, 1987).

En cuanto a la SER, los datos parecen indicar que el incremento de su transmisión en el ATV influye en el refuerzo de la cocaína, teniendo efectos opuestos los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2C}, que son los receptores de SER mejor caracterizados en términos de su interacción con el sistema dopaminérgico. El incremento de la transmisión de SER produciría sus efectos sobre el refuerzo de la cocaína a través de la modulación de la transmisión dopaminérgica. Esto último supone más apoyo a la hipótesis de la DA en el refuerzo de los psicoestimulantes (Pierce y Kumaresan, 2006).

Por otra parte, los efectos de la cocaína sobre aminoácidos excitatorios/sistema glutamatérgico y muscarínico, y receptores sigma, se cree que también contribuyen a la toxicidad en el SNC. Además, hay varios mecanismos y mediadores responsables de la vasoconstricción inducida por la cocaína, entre los que se encuentran el incremento de NE, un efecto directo de la BE sobre los vasos sanguíneos (posiblemente mediado por calcio), los niveles incrementados de endotelina-1 (vasoconstrictor), y la producción mermada de óxido nítrico (vasodilatador) (Goldstein et al., 2009).

Respecto al efecto anestésico local producido por la cocaína, al que se ha hecho referencia previamente, este se consigue mediante la inhibición competitiva de los canales rápidos de sodio en las neuronas, bloqueando por tanto la conducción nerviosa (White y Lambe, 2003).

5. INTERACCIONES ENTRE ALCOHOL Y COCAÍNA

El consumo simultáneo de alcohol y cocaína es una práctica frecuente en la población general (Hearn et al., 1991). Esta combinación es popular entre los consumidores de drogas, y está bien documentada en ambos sexos (Graziani et al., 2014; Pennings et al., 2002). En un estudio reciente acerca de la prevalencia del consumo de cocaína en adolescentes europeos, un 70% de los sujetos informaron que su primer consumo de cocaína fue bajo los efectos del alcohol (Apantaku-Olajide et al., 2013).

Según muestran algunos datos, un 60-85% de las personas que abusan de la cocaína abusan simultáneamente del alcohol (Brookoff et al., 1996; Grant y Harford, 1990). La existencia de alcoholismo comórbido en personas con abuso de cocaína tiene una prevalencia puntual estimada del 29%, y una prevalencia de tiempo de vida (alguna vez en la vida) del 62% (Rounsaville et al., 1991). Además, hay distintos estudios que cifran el consumo de alcohol por parte de los cocainómanos hasta en un 99%, las ingestas simultáneas (simultáneamente o en la misma ocasión) en un 77%, y las ingestas de alcohol al menos en cada episodio de consumo de cocaína hasta en un 30% (Dean et al., 1997). Por otra parte, Rubio et al. (2008) revelaron que el consumo de cocaína en bebedores fuertes (*heavy drinkers*) incrementó 3.8 veces el riesgo de desarrollar dependencia de alcohol. También se ha encontrado que el consumo fuerte y crónico de alcohol incrementa unas 3 veces el riesgo de consumo de cocaína (Kulaga et al., 2010).

En esta misma línea, se han descrito efectos significativos de la vía de administración de cocaína sobre el consumo de alcohol, de manera que los consumidores de polvo de cocaína informan de una mayor frecuencia de consumos fuertes de alcohol, en comparación con los consumidores de crack (Gossop et al., 2006a). Además, parece que existen diferentes patrones de consumo de la combinación cocaína-alcohol. Por ejemplo, los consumidores de cocaína en polvo informaron de un aumento del consumo de ambas sustancias cuando las consumían en combinación, mientras que los consumidores de crack, durante los episodios en los que consumían dosis altas, tendían a beber menores cantidades de alcohol de lo habitual, y con tendencia a consumirlo al final de la sesión de consumo de crack (Gossop et al., 2006b).

5.1. Farmacología de la interacción alcohol-cocaína: Cocaetileno

Cuando el alcohol y la cocaína se consumen de manera simultánea, se produce un nuevo metabolito, el cocaetileno (benzoilecgonina etil éster, etilcocaína) (Dean et al., 1992;

Hearn et al., 1991). Su formación es el resultado de la actividad de carboxilesterasas que catalizan la transesterificación del éster 2-carboximetílico de la cocaína en su derivado 2-carboxietílico. Esta conversión a cocaetileno ha sido demostrada en rata, en ratón, y en humanos (Cascales et al., 1997; Dean et al., 1991; Dean et al., 1992).

En apartados anteriores de esta tesis, se han descrito las principales vías metabólicas del alcohol, y de la cocaína en ausencia de alcohol. Aquí, se hará referencia al metabolismo de la cocaína en presencia de alcohol. En este caso, ocurren tres clases de reacciones: *hidrólisis*, *transesterificación* y *N-desmetilación* (ver Figura 7). Una carboxilesterasa inespecífica presente en el hígado humano es la encargada de catalizar la hidrólisis de la cocaína y el cocaetileno a BE, un metabolito sin actividad estimulante psicomotora (Dean et al., 1991). La norcocaína y el norcocaetileno también son sustratos de esta enzima, y pueden originar benzoilnorecgonina. El alcohol inhibe esta actividad esterasa, de forma que suprime la inactivación enzimática de la cocaína a BE, y simultáneamente cataliza la transesterificación etílica de la cocaína formando el metabolito farmacológicamente activo, cocaetileno. Esta transesterificación de la cocaína está catalizada por la misma enzima carboxilesterasa que cataliza la hidrólisis de la cocaína a BE (Dean et al., 1992). El alcohol también puede inducir la transesterificación etílica de la norcocaína a norcocaetileno. La N-desmetilación de la cocaína a norcocaína es catalizada por una enzima dependiente del citocromo P-450, bien directamente, o después de la oxidación de la cocaína a su derivado N-óxido, por una FAD monooxigenasa (Kloss et al., 1983).

Continuando con la farmacocinética, los estudios de Pan y Hedaya (1999a) indican que el alcohol altera significativamente la *absorción*, *distribución*, y *eliminación* de la cocaína, lo que da como resultado una concentración plasmática de cocaína más alta y prolongada. Sin embargo, las concentraciones de alcohol en sangre no se ven alteradas, independientemente de si la cocaína es administrada antes o después del mismo (Perez-Reyes, 1994; Perez-Reyes y Jeffcoat, 1992). Además, la coadministración de alcohol potencia la respuesta neuroquímica a la administración de cocaína (Pan y Hedaya, 1999a). Por otra parte, tanto el pretratamiento con alcohol como con cocaína, así como la coadministración aguda de alcohol, conducen a alteraciones significativas en la farmacodinamia de la cocaína, que son debidas, al menos en parte, a los cambios en la farmacocinética de la cocaína (Pan y Hedaya, 1999b). Se ha encontrado que las disposiciones farmacocinéticas de la cocaína y el cocaetileno son parecidas, con valores

de aclaramiento y volúmenes de distribución similares. Este aclaramiento, tanto de la cocaína como del cocaetilo, se vio disminuido en un 20%, aproximadamente, cuando se administraron con alcohol (Laizure et al., 2003).

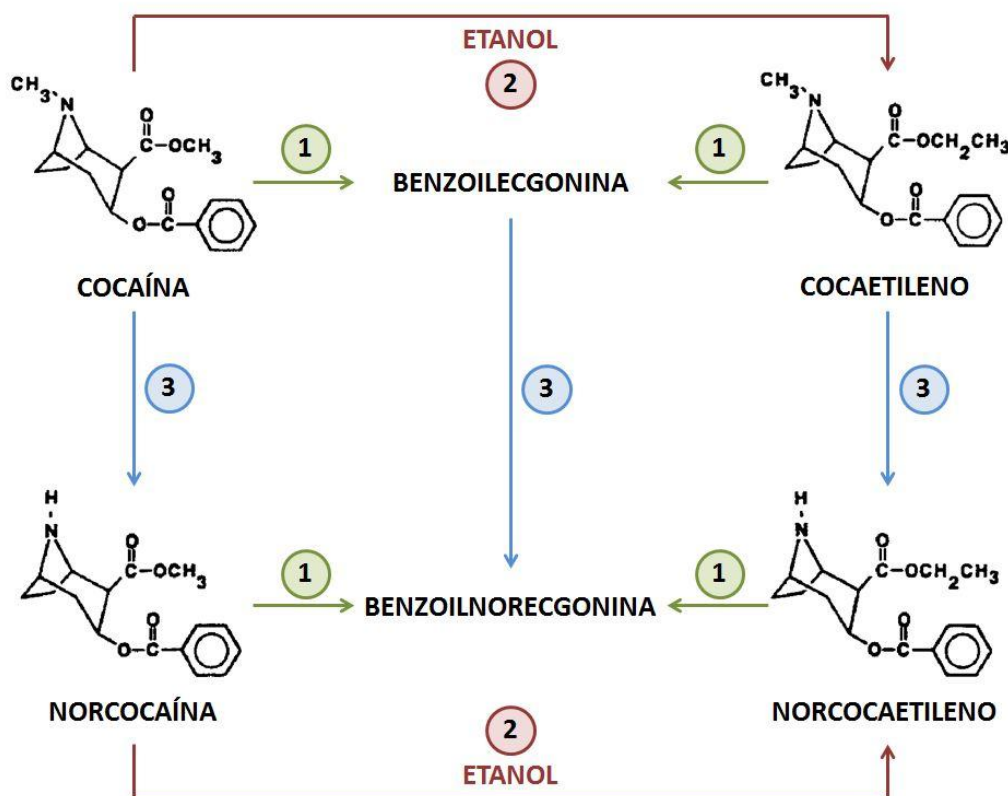


Figura 7. Metabolismo de la cocaína en presencia de etanol. (1) carboxilesterasa hepática inhibida por el etanol. (2) transesterificación inducida por el etanol. (3) N-desmetilación catalizada por una enzima dependiente del citocromo P-450. (Modificado de Cascales et al., 1997; Dean et al., 1992).

Parker y Laizure (2010) llevaron a cabo un estudio en perros en el que la coadministración de alcohol y cocaína resultó en una disminución del 23% en el aclaramiento de la cocaína intravenosa, y en un incremento del 300% en la biodisponibilidad de la cocaína por vía oral. Además, los autores infieren que el alcohol podría inhibir la hidrólisis de otros compuestos farmacológicos sujetos a hidrólisis por carboxilesterasas.

5.2. Efectos del consumo simultáneo de alcohol y cocaína

Los cambios en la farmacocinética y el perfil metabólico de la cocaína, entre los que se encuentran los mencionados en el apartado anterior, han sido implicados en los efectos farmacológicos, más intensos y de mayor duración, de la cocaína observados después

del co-abuso de alcohol y cocaína (Hearn et al., 1991). Además, en humanos, se ha mostrado que el orden de administración de estas drogas influye en los efectos de interacción entre las mismas (Perez-Reyes, 1994). En la Tabla 6 se resumen los principales resultados de estudios prospectivos y retrospectivos, en relación a los efectos psicológicos y somáticos, y las consecuencias del consumo combinado de alcohol y cocaína en humanos.

Tabla 6. Efectos del consumo combinado de alcohol y cocaína

Efectos del consumo combinado: relativos al Alcohol solo *	
Alcohol solo (Efectos dosis-dependientes)	Alcohol y Cocaína
Niveles de alcohol en sangre incrementados	Ligeramente disminuidos por altas dosis de cocaína; formación de cocaetileno
Aumento de la sensación subjetiva de embriaguez	Ligeramente disminuida
Ligero aumento de la tasa cardíaca	Tendencia a un incremento mayor que el aditivo
Deterioro en la función cognitiva y motora	Menor deterioro
Efectos del consumo combinado: relativos a la Cocaína sola *	
Cocaína sola (Efectos dosis-dependientes)	Alcohol y Cocaína
Niveles de cocaína en sangre incrementados	Hasta un 30% de aumento adicional; formación de cocaetileno
Aumento de la sensación subjetiva de "high"	Mayor que el incremento aditivo
Tasa cardíaca significativamente incrementada	Tendencia a un incremento mayor que el aditivo
Efectos variables sobre la función cognitiva y motora	Deterioro
Efectos del consumo combinado: basados en estudios retrospectivos	
Alcohol solo (Efectos dosis-dependientes)	Alcohol y Cocaína
Aumento del riesgo de cometer actos violentos	Efectos aditivos sobre la conducta y el crimen; aumento del riesgo de pensamientos y planes homicidas
Riesgo incrementado de trastornos psiquiátricos	No se han encontrado referencias
Aumento del riesgo de defectos de nacimiento	Mayor riesgo que el aditivo (una referencia)
Respiración deteriorada	No se han encontrado referencias

* Basados en estudios prospectivos

Modificado de Pennings et al., 2002

Los consumidores de cocaína ingieren alcohol debido a que la combinación de estas drogas produce efectos eufóricos más intensos y duraderos (ver Tabla 6), y disminuye efectos secundarios indeseables inducidos por la cocaína, tales como cefaleas y migrañas (Dean et al., 1997; Masur et al., 1989), que son aparentemente causados por la actividad vasoconstrictora de la cocaína o sus metabolitos (Satel y Gawin, 1989).

Por otra parte, el incremento en la actividad motora observado tras la coadministración de alcohol y cocaína en ratones, permite sugerir que el alcohol produce una

potenciación de la estimulación psicomotora inducida por cocaína (Masur et al., 1989). En otro estudio, en ratones de 2 cepas diferentes, varias de las conductas alteradas por la cocaína (como la actividad locomotora, las estereotipias, la exploración, y la tigmotaxis) se vieron afectadas de manera diferencial por el tratamiento simultáneo con alcohol. Sin embargo, los datos ponen de manifiesto la importancia que tienen las diferencias genéticas sobre los efectos conductuales del consumo de estas dos sustancias, observando, por ejemplo, diferencias entre las dos cepas de animales en relación a los efectos del alcohol sobre la estimulación locomotora inducida por la cocaína (Cook et al., 1998).

También han sido descritas varias alteraciones producidas por dosis toleradas de ambas drogas, entre las que se encuentran la elevación de la peroxidación lipídica y de la actividad de los radicales libres, y la necrosis hepatocelular (Odeleye et al., 1993). El alcohol incrementa significativamente los efectos tóxicos de la cocaína en hepatocitos humanos (Ponsoda et al., 1992), e inhibe el metabolismo hidrolítico de la cocaína, haciendo que este se desvíe hacia el metabolismo oxidativo, con lo que se elevaría la hepatotoxicidad (Cascales et al., 1997). Otra de las consecuencias importantes del co-abuso de ambas sustancias es el incremento en 18 veces del riesgo de muerte súbita asociado a cocaína (Rose et al., 1990), lo que está relacionado con los datos obtenidos en ratones, que muestran una mayor mortalidad por la formación de cocaetileno, debido a que su LD₅₀ es significativamente menor que la de la cocaína (Hearn et al., 1991).

Aunque, en general, no hay evidencia de que la combinación de ambas drogas haga más que aumentar de forma aditiva la fuerte tendencia de cada droga de inducir una variedad de trastornos físicos y psicológicos, existen ciertas excepciones. Por ejemplo, la cocaína antagoniza de forma consistente algunos déficits inducidos por alcohol, como es el caso de déficits de aprendizaje y de rendimiento psicomotor (ver Tabla 6). Además, la combinación de ambas drogas tiende a tener efectos más grandes que los meramente aditivos sobre la tasa cardíaca (Pennings et al., 2002).

6. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

6.1. Tratamientos farmacológicos en la adicción al alcohol

En apartados anteriores de este manuscrito se ha hecho referencia a las complejas interacciones entre genética y ambiente. Esto no sólo conlleva una gran heterogeneidad en cuanto a las dimensiones de los síntomas y severidad del alcoholismo, sino que también implica una amplia variabilidad en la respuesta a los tratamientos. De hecho, sólo entre un 20% y un 30% de los pacientes tratados responden a los llamados compuestos anti-craving y anti-recaída (Spanagel, 2009).

Algunos medicamentos que se utilizan en la actualidad, o que están en desarrollo, para tratar la dependencia al alcohol, tienen como objetivo las vías de neurotransmisión del refuerzo, ya sea para normalizar las adaptaciones debidas al consumo crónico de alcohol o para bloquear el refuerzo. Otros fármacos, sin embargo, intentan restaurar el equilibrio entre vías de neurotransmisores inhibitorios y excitatorios que contribuyen a la hiperexcitabilidad por la abstinencia de alcohol y a los estados afectivos negativos que pueden promover la recaída al consumo (Clapp, 2012). A continuación aparece un resumen con los fármacos aprobados hasta el momento, así como los que se encuentran en desarrollo, para el tratamiento de la dependencia de alcohol, haciendo hincapié en los fármacos que han sido utilizados en los distintos estudios incluidos en esta tesis.

6.1.1. Tratamientos farmacológicos aprobados

- *Disulfiram*

El disulfiram (Antabus®) fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos, FDA (Food and Drug Administration, USA), en 1951 para el uso como disuasorio del consumo de alcohol. Este fármaco inhibe la actividad de la enzima ALDH, impidiendo así el metabolismo del acetaldehído (Franck y Jayaram-Lindström, 2013). De esta forma, si se ingieren pequeñas cantidades de alcohol después de la administración de disulfiram, el acetaldehído se acumula, incrementándose entre 5 y 10 veces su concentración en sangre. Esta acumulación de acetaldehído produce reacciones fisiológicas desagradables, como sudoración, dolor de cabeza, enrojecimiento, náuseas, vómito, hipotensión, y taquicardia, entre otras, que desaniman al individuo a seguir consumiendo (Clapp, 2012; Franck y Jayaram-Lindström, 2013). Las pruebas de la eficacia del disulfiram son limitadas, pero el predictor más fuerte de un efecto del

tratamiento se observa en ensayos donde la administración del fármaco se realiza bajo supervisión (Krampe y Ehrenreich, 2010). Dada la naturaleza aversiva de este tratamiento, el incumplimiento es uno de los mayores retos en su utilización. El disulfiram debe utilizarse con precaución en pacientes con patologías hepáticas, y está contraindicado en pacientes con enfermedades cardíacas (Clapp, 2012). Actualmente se considera un tratamiento anticuado, ya que no va orientado hacia los fenómenos fundamentales de la dependencia de alcohol (Heilig y Egli, 2006).

- *Naltrexona*

La naltrexona, en 1994, pasó a ser el segundo medicamento aprobado por la FDA como tratamiento para la dependencia de alcohol. La naltrexona es un antagonista opioide, cuya eficacia clínica se cree que está mediada por las interacciones entre los sistemas dopaminérgico y opioide endógeno (Clapp, 2012). Los opioides endógenos (como las endorfinas y encefalinas) están implicados en los efectos reforzantes del alcohol. En modelos animales de consumo de alcohol, se ha visto que el alcohol promueve la liberación de β -endorfinas en áreas cerebrales implicadas en el refuerzo. Las β -endorfinas estimulan la liberación de dopamina en el NAc, bien debido a sus efectos en el ATV, o actuando directamente en el NAc (Gianoulakis, 1998; Marinelli et al., 2003). Los efectos centrales de las β -endorfinas son mediados a través de los receptores μ opioides. Además, la naltrexona muestra mayor afinidad por el receptor μ , con una selectividad relativa por este receptor a dosis bajas (Heilig y Egli, 2006). Cuando la naltrexona se administra por vía oral, se absorbe rápidamente y se somete a metabolismo de primer paso hepático. El principal metabolito es el 6- β -naltrexol, que reduce por sí mismo el consumo de alcohol en ratas (Rukstalis et al., 2000).

La naltrexona es relativamente bien tolerada, siendo el principal efecto secundario el malestar gastrointestinal. Se ha sugerido que las dosis altas incrementan el riesgo de hepatotoxicidad. Además, el uso de este fármaco, al tratarse de un antagonista opioide, está contraindicado en pacientes alcohólicos que consuman también drogas opioides ya que puede precipitar el síndrome de abstinencia opioide (Clapp, 2012). Por lo general, en estudios en humanos, se ha visto que la naltrexona oral tiene un efecto superior al placebo tanto en la prevención de la recaída en consumidores fuertes de alcohol, tras un periodo inicial de abstinencia, como en la reducción del ansia por consumir (*craving*) y en el incremento del porcentaje de días en abstinencia. Uno de los hallazgos más

consistentes con este tratamiento es el incremento en el tiempo hasta la recaída (Franck y Jayaram-Lindström, 2013).

Desde una aproximación genética, se han encontrado algunos indicadores de una respuesta positiva a la naltrexona. Por ejemplo, en pacientes alcohólicos con historia familiar de alcoholismo, la naltrexona parece producir una mayor reducción en el consumo de alcohol con respecto a aquellos sin historia familiar de alcoholismo (Krishnan-Sarin et al., 2007). Además, la presencia de un polimorfismo en el gen del receptor μ opioide (Asn40Asp) se ha asociado con una respuesta más favorable al tratamiento con naltrexona en algunos estudios, aunque no en otros (Anton, 2008; Gelernter et al., 2007).

Dada la poca adherencia a un régimen diario de naltrexona por vía oral, según las observaciones clínicas, se desarrolló la formulación de liberación prolongada, Vivitrex®/Vivitrol®, para inyecciones intramusculares mensuales. Vivitrol® muestra picos reducidos y fluctuaciones mínimas de los niveles en plasma, lo que puede mejorar el perfil de efectos adversos con respecto a la preparación oral (Clapp, 2012). Así mismo, tiene un riesgo más bajo de hepatotoxicidad, comparado con la formulación oral, dado que el fármaco no se ve sometido a metabolismo de primer paso hepático (Franck y Jayaram-Lindström, 2013).

- *Acamprosato*

Fue aprobado por la FDA, en 2004, como tratamiento farmacológico para la dependencia de alcohol. El acamprosato (*N*-acetil homotaurina de calcio), está disponible para la administración en una fórmula oral de liberación retardada (Campral®). Aunque los mecanismos de acción de este fármaco no se conocen bien, sus efectos neuroquímicos se han atribuido a su antagonismo de los receptores NMDA de glutamato (Franck y Jayaram-Lindström, 2013; Spanagel y Zieglgänsberger, 1997). También se ha sugerido que puede modular la neurotransmisión a través de los receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 5 (mGluR5), reduciendo así la acumulación de glutamato durante episodios repetidos de abstinencia de alcohol (Clapp, 2012) (ver Figura 8). Este tratamiento normalizaría el equilibrio entre las vías excitatorias (glutamato) e inhibitorias (GABA), que se encuentran desreguladas después del consumo crónico de alcohol, y mitiga el malestar psicológico y fisiológico asociado a la abstinencia (Littleton y Zieglgänsberger, 2003; Spanagel y Kiefer, 2008). Se cree

que estos efectos se dan gracias, también, a la disminución tanto de la hiperexcitabilidad dopaminérgica en el NAc durante la abstinencia de alcohol, como de la hiperexcitabilidad neuronal general (Hammarberg et al., 2009).

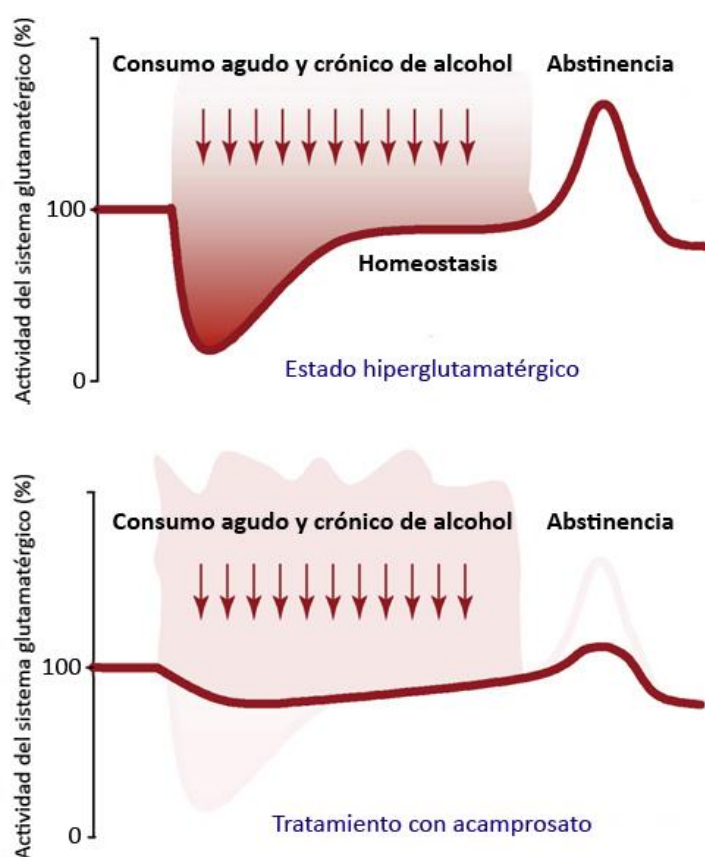


Figura 8. Acción antiglutamatérgica del acamprosato (modificada de Spanagel y Kiefer, 2008).

Según muestran algunos datos, en los pacientes tratados con acamprosato aumenta la tasa de abstinencia completa, el porcentaje de días en abstinencia y el tiempo hasta el primer consumo (Kranzler y Gage, 2008). En general, este fármaco ha demostrado efectos pequeños o moderados con respecto a la reducción del consumo de alcohol y las medidas subjetivas del ansia por consumirlo, así como promoviendo la abstinencia (Franck y Jayaram-Lindström, 2013). Por otra parte, según los resultados de varios estudios, la eficacia del acamprosato no ha sido asociada a ninguna variable predictora, lo que permite considerarlo como una farmacoterapia potencialmente efectiva para todos los pacientes con dependencia de alcohol (Mason y Leher, 2012; Verheul et al., 2005). También es importante señalar que el acamprosato cuenta con un perfil favorable

de seguridad y tolerabilidad, y los pacientes, en todos los ensayos clínicos, informan de efectos secundarios mínimos, siendo la diarrea el más frecuente (Mann, 2004).

- *Nalmefeno*

El nalmefeno (Selincro®) fue aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en febrero de 2013, para la reducción del consumo de alcohol en pacientes dependientes que presenten un nivel elevado de riesgo de consumo, sin síntomas de abstinencia física y que no requieran desintoxicación inmediata (EMA, 2013). El nalmefeno, estructuralmente relacionado con la naltrexona, es un modulador del sistema opioide que tiene un efecto antagonista sobre los receptores μ y δ , y un efecto agonista parcial sobre el receptor κ (Bart et al., 2005; Müller et al., 2014). En comparación con la naltrexona, el nalmefeno parece ofrecer varias ventajas potenciales entre las que se encuentran una unión más efectiva a los receptores opioides centrales (Emmerson et al., 1994; Ingman et al., 2005), más alta biodisponibilidad (Dixon et al., 1987; Gal et al., 1986), y la ausencia de una asociación dosis-dependiente con toxicidad en el hígado (Mason et al., 1999). Además, el nalmefeno tiene un inicio más lento y una duración de la acción más prolongada que la naltrexona (Soyka, 2014).

El nalmefeno, en general, es bien tolerado, y los principales efectos adversos son náuseas, mareos, insomnio, y dolor de cabeza. La mayoría de estas reacciones son leves o moderadas y de corta duración (Paille y Martini, 2014).

6.1.2. Nuevos enfoques en el tratamiento farmacológico

En este apartado se hará referencia a los principales tratamientos farmacológicos que aún no han sido aprobados y que son enfoques actuales para el tratamiento de la dependencia de alcohol. En la Tabla 7 se muestra un resumen de los mecanismos de acción y resultados más importantes en relación a algunos de estos fármacos, los cuales han sido, y siguen siendo, evaluados en ensayos controlados aleatorios. Dentro de esta variedad de compuestos, el topiramato será el foco de atención, dado que, además de su relevancia como farmacoterapia potencial, forma parte de los estudios incluidos en la presente tesis.

Tabla 7. Fármacos no aprobados para el tratamiento de la dependencia de alcohol

	Mecanismos de acción	Resultados principales	Referencias
Baclofeno	Antiespástico. Agonista del receptor metabotrópico GABA-B.	↑abstinencia total. ↓consumo de alcohol y craving. Eficacia en pacientes con cirrosis.	Addolorato y Leggio, 2010.
Ondansetrón	Antiemético. Antagonista selectivo del receptor 5-HT ₃ .	↓consumo en pacientes con dependencia de alcohol (inicio temprano). ↓consumo y ↑porcentaje días en abstinencia, en subgrupos de pacientes de acuerdo al genotipo.	Johnson et al., 2013. Müller et al., 2014.
Gabapentina	Anticonvulsivante no benzodiacepínico análogo a GABA. Acción mediada a través de los canales de calcio sensibles al voltaje.	↓consumo de alcohol y porcentaje de días de consumo fuerte. ↓craving. ↑porcentaje de días en abstinencia.	Brodie et al., 2011. Furieri y Nakamura-Palacios, 2007. Mason et al., 2014.
Vareniclina	Agonista parcial de los receptores de acetilcolina nicotínicos $\alpha 4\beta 2$. Aprobado para dejar de fumar.	↓consumo de alcohol y ↓craving por alcohol, en dependientes de alcohol fumadores y no fumadores.	Litten et al., 2013. Mitchell et al., 2012. Steensland et al., 2007.
Prazosina	Antagonista adrenérgico $\alpha 1$.	↓consumo de alcohol, en pacientes dependientes de alcohol, con y sin comorbilidad con trastorno por estrés postraumático.	Simpson et al., 2015. Simpson et al., 2009.

↑ Aumento; ↓ Disminución

- *Topiramato*

El topiramato es un sulfamato sustituido análogo de la fructosa-1,6-difosfato, químicamente identificado como 2,3:4,5-bis-O-(1-metietilideno)-B-D-fructopiranosulfamato, que fue sintetizado originalmente como un potencial agente antidiabético (Johnson, 2005). En 1996, el topiramato (Topamax®) fue aprobado por la FDA para el tratamiento de la epilepsia (FDA, 1996), y posteriormente para la prevención de la migraña en adultos (FDA, 2004). El uso fuera de indicación del topiramato incluye el tratamiento adyuvante del trastorno bipolar, el trastorno por estrés post-traumático, la bulimia nerviosa, la obesidad, entre otros. Además, hay cada vez más estudios que examinan la eficacia del topiramato en diferentes trastornos relacionados con el consumo de sustancias como el alcohol, la nicotina, o la cocaína (Cohen et al., 2014; Shinn y Greenfield, 2010).

El topiramato tiene seis mecanismos de acción importantes:

- Potenciación de las corrientes inhibitorias mediadas por el receptor GABA_A. Este fármaco ejerce su efecto inhibitor por mecanismos independientes de los de las benzodiacepinas y barbitúricos (White et al., 1997, 2000).
- Antagonismo de los receptores de glutamato AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxasole-4-propiónico) y kainato, y no afecta al receptor NMDA (Gryder y Rogawski, 2003; Skradski y White, 2000).
- Inhibición de los canales de calcio tipo L y limitación de los sistemas de segundo mensajero dependientes de calcio (Zhang et al., 2000).
- Limitación de la despolarización y excitabilidad dependientes de actividad de los canales de sodio dependientes de voltaje (Taverna et al., 1999).
- Activación de la conductancia de potasio (Herrero et al., 2002).
- Inhibición débil de las isoenzimas II y IV de la anhidrasa carbónica en neuronas y tejidos periféricos. En los túbulos renales, esta inhibición aumenta la probabilidad de acidosis y formación de cálculos renales (Dodgson et al., 2000).

A través de distintos mecanismos de acción (ver Figura 9), el topiramato puede modular el craving asociado al alcoholismo, además de sus efectos sobre la abstinencia en alcoholismo crónico. Las propiedades del topiramato podrían sugerir el uso de este tratamiento para el espectro completo de abstinencia, y prevención de la recaída, en la dependencia de alcohol (ver De Sousa, 2010 y Kenna et al., 2009 para una revisión del tema).

El perfil de efectos adversos del topiramato es bastante benigno. Los efectos secundarios más comunes son parestesias transitorias y deterioro cognitivo a la hora de encontrar palabras y otras dificultades menores. También se ha descrito pérdida de peso, anorexia, casos de miopía aguda y de glaucoma de ángulo cerrado (De Sousa, 2010; Nieto-Barrera, 2002).

Además de los tratamientos farmacológicos mencionados anteriormente en la dependencia de alcohol, existen otros que están siendo estudiados en la actualidad. En el caso de algunos compuestos se trata de estudios preclínicos, como aproximación a la posible efectividad del fármaco, mientras que otros compuestos ya están siendo evaluados en ensayos con pacientes. Algunos de los fármacos que se encuentran en fase clínica son, por ejemplo, antidepresivos o antipsicóticos, como la *Fluvoxamina*, el *Aripiprazol*, y el *Flupentixol* (para revisión ver Aubin y Daeppen, 2013; Spanagel y

Kiefer, 2008). Hay bastante literatura científica en relación a muchos compuestos, que tienen distintos mecanismos de acción, y que se encuentran en fase preclínica, como por ejemplo agentes que modulan el receptor nicotínico, o el receptor 5-HT7, o nuevos anticonvulsivantes, entre otros (Hauser et al., 2015; Padula et al., 2013; Rahman, et al., 2015).

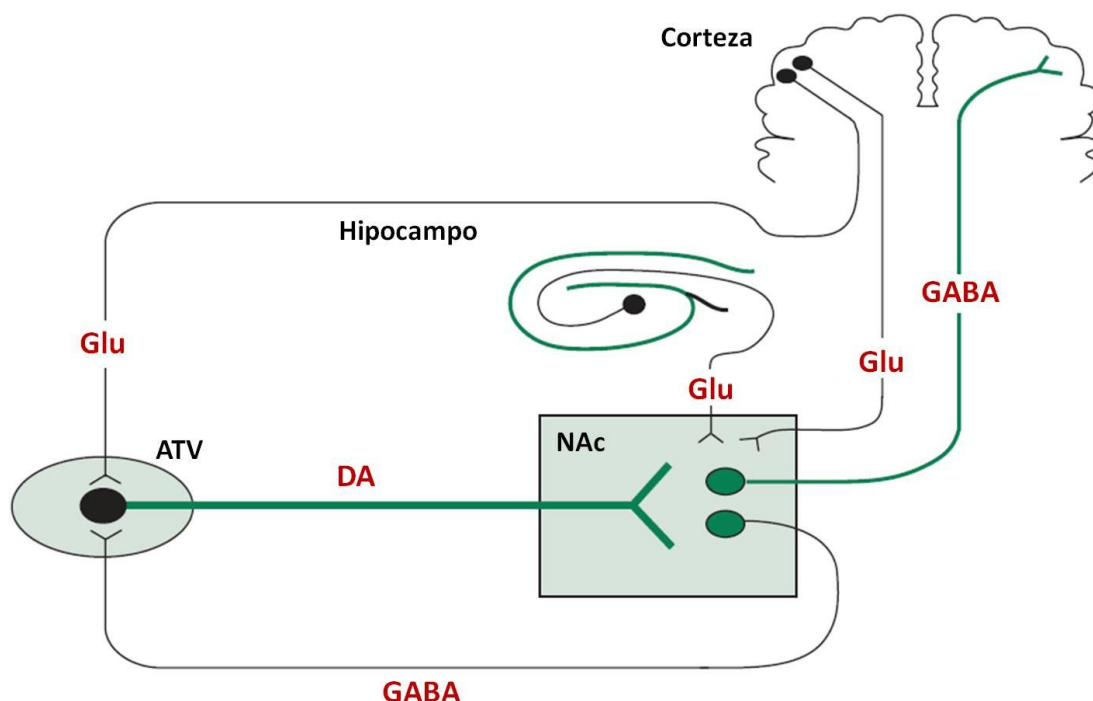


Figura 9. Mecanismos de acción del topiramato en el SNC. Incremento de GABA y disminución de Glu al ATV, suprimiendo el aporte de DA al NAc. También, reducción de la hipersensibilidad glutamatergica en el hipocampo y la corteza, lo que resulta en una disminución de GABA/Glu y la inhibición de la recompensa desde el NAc a la corteza (modificada de Johnson, 2004).

6.2. Tratamientos farmacológicos en la adicción a la cocaína

Hasta el momento no ha sido aprobada ninguna terapia farmacológica para el tratamiento de la dependencia de cocaína, a pesar de la gran necesidad de encontrar un tratamiento eficaz. Muchos de los compuestos que son objeto de estudio en ensayos clínicos intentan modular las alteraciones neuroquímicas que se dan en los sujetos dependientes de cocaína. Estos fármacos modulan, predominantemente, la señalización de DA, SER, Glu, GABA, o NE. Por otra parte, existen terapias experimentales, que se encuentran en fases iniciales de desarrollo, cuyo objetivo es interceptar la cocaína antes de que alcance los centros de recompensa cerebrales, o evitar la expresión de genes resultado de los cambios inducidos por la cocaína a largo plazo. Estas terapias

experimentales incluyen, por ejemplo, la vacuna anti-cocaína y los aceleradores del metabolismo de la cocaína.

6.2.1. Fármacos dopaminérgicos

Este grupo de fármacos representa el 40% de los ensayos clínicos en fase II, en el año 2014, para el tratamiento de la adicción a la cocaína (Kim y Lawrence, 2014).

El *modafinilo* es un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la narcolepsia. Aunque sus mecanismos de acción no están del todo claros, los datos sugieren que este compuesto inhibe el DAT, incrementando los niveles extracelulares de DA, y que tiene una actividad agonista de los receptores D2. Además, inhibe los NETs, aumenta la función de 5-HT, y estimula la liberación de Glu e histamina (Minzenberg y Carter, 2008; Zolkowska et al., 2009). A través de estos mecanismos, el modafinilo podría contrarrestar algunas de las alteraciones observadas en estos sistemas, en pacientes dependientes de cocaína. Aunque no hay evidencias fuertes de que este fármaco promueva sustancialmente la abstinencia en consumidores de cocaína, algunos estudios mostraron resultados positivos que incluyen la reducción de los efectos subjetivos de la cocaína (Hart et al., 2008; Malcolm et al., 2006), además de una disminución del *craving* y un aumento en los días sin consumo de cocaína, en pacientes sin dependencia comórbida de alcohol (Anderson et al., 2009). Por otra parte, otros estudios no han encontrado diferencias significativas comparando con el placebo o con terapias conductuales (Dackis et al., 2005; Schmitz et al., 2014). Sin embargo, hay que destacar las mejoras que se han observado con este tratamiento en algunas medidas cognitivas, como la toma de decisiones, la memoria de trabajo y la atención sostenida (Baranski et al., 2004; Kalechstein et al., 2013; Turner et al., 2003).

Las *anfetaminas* producen una liberación de monoaminas, en particular de DA, y también bloquean la recaptación de las mismas (Fleckenstein et al., 2007). Estas acciones son similares a la cocaína. Las sales de anfetamina tienen unas características farmacocinéticas que sugieren un potencial de abuso bajo, lo que ha permitido sugerirlas como una terapia de sustitución para la adicción a la cocaína (Rush et al., 2009; Stoops et al., 2004). El objetivo de esta terapia de sustitución no sería curar la adicción si no mejorar la calidad de vida de los individuos adictos. Varios estudios en consumidores de cocaína, muestran resultados prometedores acerca de la dextroanfetamina, comparada con el placebo (Grabowski et al., 2004; Shearer et al.,

2003). La metanfetamina y el mazindol son compuestos que también han sido estudiados para el tratamiento de la dependencia de cocaína (Mariani y Levin, 2012) y, al igual que en los casos anteriores, son necesarias más investigaciones en relación a sus potenciales efectos beneficiosos.

La *levodopa* y el *ropinirol* son fármacos aprobados para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, y han sido estudiados en el ámbito de la dependencia de cocaína. Respecto a la levodopa encontramos resultados contradictorios, varios estudios centrados en su efecto sobre la abstinencia no encuentran efectos beneficiosos en las condiciones estudiadas (Mooney et al., 2007; Wolfsohn et al., 1993), mientras que otros sí encuentran algún resultado positivo en el incremento del tiempo de abstinencia (Schmitz et al., 2008, 2010). Por el contrario, El ropinirol ha mostrado resultados destacables sobre las medidas de abstinencia en individuos dependientes de cocaína (Meini et al., 2008, 2011), disminuyendo, por ejemplo, la intensidad del *craving* y el consumo semanal de la droga. Sin embargo, estos datos no cuentan con grupo placebo, por lo que es necesario replicar los resultados en estudios más controlados.

El *nepicastat* es un inhibidor de la dopamina β -hidroxilasa, por tanto reduciendo la conversión de DA en NE (Stanley et al., 1997). Actualmente, un par de ensayos clínicos en fase II investigan los efectos de este tratamiento en la dependencia de cocaína. De la Garza II et al. encuentran que el nepicastat puede suprimir los efectos subjetivos positivos inducidos por la cocaína en pacientes con trastorno por consumo de cocaína (De la Garza II et al., 2015). Por otra parte, el *disulfiram*, al cual ya se ha hecho referencia en el apartado sobre los tratamientos de la dependencia de alcohol, también es un inhibidor de la dopamina β -hidroxilasa (Weinshenker, 2010). Este fármaco ha mostrado algunos resultados prometedores en el tratamiento de la dependencia de cocaína, en pacientes con y sin co-abuso de opioides (Carroll et al., 2004; George et al., 2000; Kosten et al., 2013; Oliveto et al., 2011; Petrakis et al., 2000).

6.2.2. Fármacos serotoninérgicos

La *bupiriona*, un agonista parcial de los receptores 5-HT_{1A}, está aprobada por la FDA para el tratamiento del trastorno de ansiedad generalizada. Este fármaco, en comparación con placebo, mostró una reducción de los síntomas asociados con la retirada de la cocaína (Giannini et al., 1993), aunque en un ensayo doble ciego posterior no se observó ningún efecto de la bupiriona (Moeller et al., 2001). Por otra parte, el

ondansetrón, al cual se ha hecho referencia con anterioridad, también ha sido evaluado en un estudio como tratamiento de la dependencia de cocaína, mostrando resultados positivos pero con limitaciones que los distorsionan (Johnson et al., 2006; Kim y Lawrence, 2014). La *psilocibina*, un agonista de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{1A}, se encuentra de manera natural en setas alucinógenas. Aún no ha sido aprobada para el tratamiento de ningún trastorno (Kim y Lawrence, 2014), pero actualmente se está llevando a cabo un ensayo en fase II con este compuesto en relación con el consumo de cocaína, cuyos resultados no han sido publicados (ClinicalTrials.gov).

6.2.3. Fármacos GABAérgicos / glutamatérgicos

El *topiramato*, un fármaco al que se ha hecho referencia en el apartado 6.1.2 y que está incluido en los experimentos que componen esta tesis, también ha sido estudiado en el tratamiento de la dependencia de cocaína. Los datos de un estudio reciente parecen sugerir que el topiramato puede reducir el riesgo de abuso de cocaína para altas dosis de la misma, pero lo incrementaría si se trata de dosis bajas de esta droga (Johnson et al., 2013a). Según datos obtenidos por Kampman y colaboradores, este tratamiento no iniciaría la abstinencia en los sujetos, pero sí la prolonga en aquellos que ya son abstinentes. Los investigadores también observaron una alta retención al estudio por parte de los sujetos, lo que podría ser debido a la terapia cognitivo-conductual (Kampman et al., 2004). Estos hallazgos fueron replicados por un estudio más reciente en sujetos dependientes de cocaína, en el que también se utilizó terapia cognitivo-conductual (Johnson et al., 2013b). Teniendo en cuenta estos resultados, y los obtenidos en un estudio piloto (Reis et al., 2008), la eficacia del topiramato parece depender en gran medida de que los pacientes reciban regularmente terapia cognitivo-conductual concomitantemente (Kim y Lawrence, 2014). Otro ensayo, en el que la combinación de sales de anfetamina y topiramato promueve significativamente la abstinencia en individuos dependientes de cocaína, aporta datos en la misma dirección (Mariani et al., 2012).

En el caso del *baclofeno*, su valor clínico en la adicción a la cocaína no está claro. Se ha visto que este fármaco puede ser eficaz en la reducción del consumo de cocaína, en comparación con el placebo, pero sin afectar a la retención ni al *craving* por cocaína (Shoptaw et al., 2003). Sin embargo, el estudio de Kahn et al. (2009) no mostró ninguna eficacia del baclofeno.

La *ketamina*, un antagonista de los receptores NMDA de Glu, está aprobada para la inducción y mantenimiento de la anestesia general. Según los datos que existen sobre este fármaco, su uso como terapia de reemplazo de forma crónica puede ser peligroso, con un alto riesgo de abuso, especialmente cuando hay consumo simultáneo de cocaína (Jansen y Darracot-Cankovic, 2001; Lankenau et al., 2010; Olthuis et al., 2013). Solamente la ketamina de forma aguda parecería viable para consumidores de cocaína (Kim y Lawrence, 2014). En la actualidad, hay dos ensayos clínicos en fase II que evalúan la eficacia de este fármaco en la dependencia de cocaína (ClinicalTrials.gov).

La N-acetilcisteína, un agente glutamatérgico seguro y bien tolerado, también ha sido estudiada como farmacoterapia potencial en el tratamiento de la adicción a cocaína. Los datos sobre este compuesto muestran una disminución del *craving* por cocaína, eficacia en la prevención de la recaída en sujetos abstinentes, reducción del consumo de cocaína y de la impulsividad (LaRowe et al., 2013; Schmaal et al., 2012; para revisión ver Asevedo et al., 2014 y McClure et al., 2014).

6.2.4. Otros fármacos

Tabla 8. Fármacos: eficacia potencial basada en estudios clínicos

	Promover la Abstinencia	Facilitar la Terapia Cognitivo-Conductual
Beneficio	Sales de anfetamina (como terapia de sustitución) Ropinirol Topiramato Doxazosina TA-CD	Modafinil* Levodopa Ropinirol* Topiramato Aripiprazol* Baclofeno* Propranolol*
Poco o Sin Beneficio	Modafinilo Levodopa Aripiprazol Buspirona Baclofeno Ketamina* Propranolol Vareniclina	Sales de anfetamina (como terapia de sustitución)* Ketamina* TA-CD*
Poca o Sin Información	Nepicastat, Ondansetrón, Psilocibina, Carvedilol, Lidocaína, Mifepristona, Candesartán	

*Eficacia potencial basada en su perfil farmacológico y datos preclínicos.

Modificada de Kim y Lawrence, 2014

Hay una variedad de compuestos, aparte de los comentados anteriormente, que están siendo evaluados en ensayos en fase II. Este es el caso de fármacos noradrenérgicos, como la *doxazosina*, el *carvedilol* y el *propranolol*, y de otros compuestos como la *lidocaína*, *vareniclina*, *mifepristona* (RU-486), y el *candesartán* (Kim y Lawrence, 2014). En la Tabla 8 se muestra información acerca de la eficacia potencial de estos fármacos, así como de los comentados en el apartado anterior, a la hora de promover la abstinencia y de facilitar la terapia cognitivo-conductual en el tratamiento de la dependencia de cocaína.

6.2.5. Nuevos enfoques terapéuticos

En la actualidad se están desarrollando una serie de terapias que, desde un enfoque farmacocinético, buscan prevenir la entrada de la cocaína en el SNC, aumentar la difusión de esta droga, y mitigar la acción posterior en el SNC. Su objetivo sería neutralizar o metabolizar la cocaína, más que contrarrestar sus efectos clínicos. Entre estos tratamientos encontramos el uso de *enzimas* que metabolizan la cocaína, las *vacunas*, y la *emulsión de lípidos*. Esta última ha mostrado ser eficaz en la gestión de casos resistentes y puede ser un tratamiento de rescate económico de pacientes con toxicidad grave de cocaína (Connors y Hoffman, 2013). Por otra parte, se estudian un grupo de compuestos reguladores del factor de transcripción $\Delta FosB$, que modularían su unión al ADN. Estas moléculas pueden ser usadas para evaluar la utilidad de $\Delta FosB$ como una diana terapéutica (Wang et al., 2012).

- *Vacuna contra la cocaína (TA-CD)*: está compuesta de un hapteno de cocaína conjugado con la subunidad B de la toxina del cólera inactivada, dando lugar a una molécula capaz de estimular una respuesta de anticuerpos (específicos de cocaína). Estos anticuerpos se unirán a la cocaína en el torrente sanguíneo, formando un complejo antígeno-anticuerpo incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica (ver Figura 10), debido a su mayor tamaño (Shorter y Kosten, 2011). Esta vacuna se encuentra actualmente en ensayo clínico fase II. Kosten et al. hacen una revisión del tema, y comentan que, basándose en el éxito de esta vacuna en los primeros ensayos clínicos, puede tratarse de una de las primeras vacunas anti-adicción (Kosten et al., 2014).

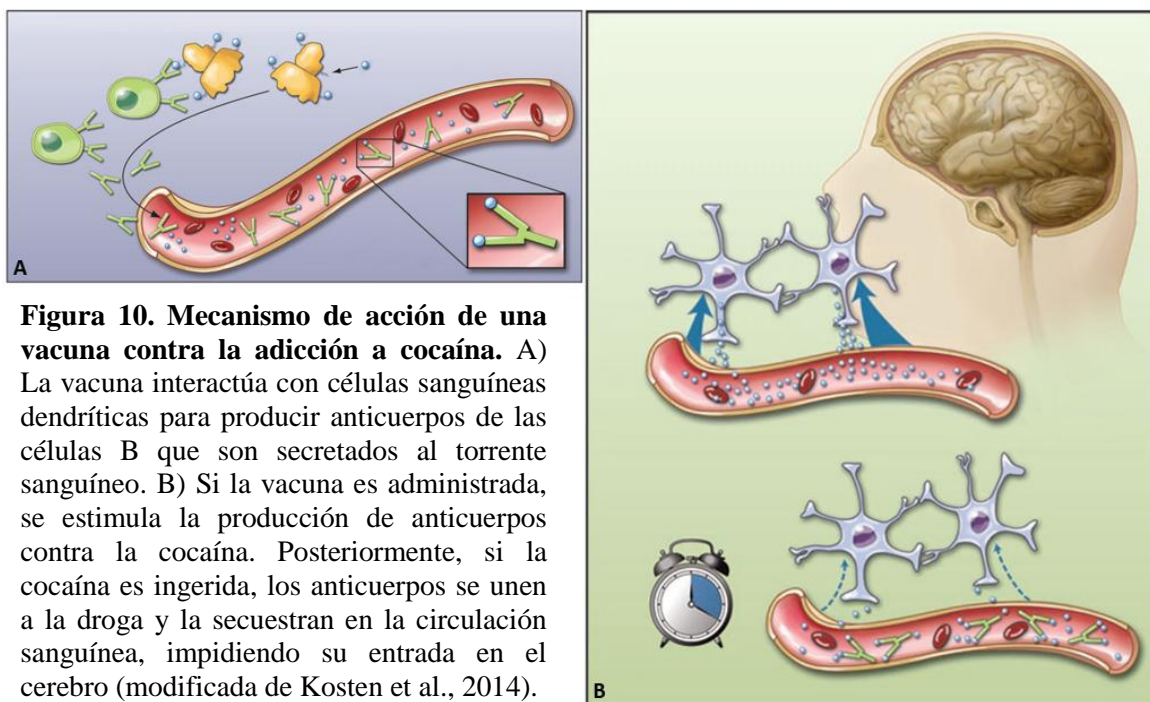


Figura 10. Mecanismo de acción de una vacuna contra la adicción a cocaína. A) La vacuna interactúa con células sanguíneas dendríticas para producir anticuerpos de las células B que son secretados al torrente sanguíneo. B) Si la vacuna es administrada, se estimula la producción de anticuerpos contra la cocaína. Posteriormente, si la cocaína es ingerida, los anticuerpos se unen a la droga y la secuestran en la circulación sanguínea, impidiendo su entrada en el cerebro (modificada de Kosten et al., 2014).

- *Enzimas*: esta aproximación trata de metabolizar la cocaína rápidamente, produciendo metabolitos biológicamente inactivos, antes de que alcance los centros cerebrales del refuerzo. La vía más prometedora es mediante el uso de una hidrolasa de cocaína (CocH), generada mediante mutaciones de la enzima humana butirilcolinesterasa (BChE) que presenta una mayor actividad catalítica sobre la cocaína que la nativa (Xue et al., 2013). Zlebnik et al. sugieren que la transferencia de genes de esta enzima con un vector viral puede producir niveles de CocH en plasma que provoquen una disminución del consumo de cocaína a largo plazo (Zlebnik et al., 2014). Otras opciones, que también están siendo estudiadas, son tanto el desarrollo de anticuerpos catalíticos contra la cocaína, como una esterasa de cocaína bacteriana (CocE) encontrada en el suelo de las plantas de coca (ver revisión de Schindler y Goldberg, 2012). Por otra parte, estudios en roedores sobre la combinación de la CocH con la vacuna han mostrado resultados bastante prometedores (Brimijoin et al., 2013; Connors y Hoffman, 2013).

6.3. Tratamientos farmacológicos en la adicción al alcohol y a la cocaína

En el caso de la codependencia de alcohol y cocaína, los tratamientos que buscan específicamente reducir el consumo solamente de una de las dos sustancias pueden ser inadecuados, y la mejor estrategia puede ser una cuyas dianas sean ambas adicciones simultáneamente (Kampman et al., 2013). Los pacientes con esta codependencia tienden

a tener más problemas psicosociales, es más probable que no se adhieran a los regímenes de tratamiento y, en general, los tratamientos tienen peores resultados en comparación con los tratamientos de la dependencia a una sola de las drogas (Brady et al., 1995; Brower et al., 1994; Heil et al., 2001).

Como se ha comentado en los apartados 6.1 y 6.2, hay tratamientos farmacológicos aprobados para la dependencia de alcohol, pero no para la dependencia de cocaína. Sin embargo, las similitudes en la fisiopatología de ambas dependencias sugieren que estos trastornos podrían responder a los mismos medicamentos (Johnson, 2005). En la actualidad, encontramos varios ensayos clínicos en fase II en los que se evalúa la eficacia de distintos fármacos en el tratamiento de la dependencia simultánea de alcohol y cocaína (ClinicalTrials.gov).

La **naltrexona**, en dosis altas, ha mostrado eficacia en la reducción del consumo de alcohol y cocaína en pacientes varones dependientes de ambas drogas, sin observarse estos beneficios en mujeres (Pettinati et al., 2008), ni a dosis bajas del fármaco (Hersh et al., 1998; Schmitz et al., 2004). Schmitz et al. no encontraron efectos de la naltrexona sobre el consumo de cocaína, aunque a dosis altas sí redujo la frecuencia de consumos fuertes de alcohol (Schmitz et al., 2009). En un estudio piloto reciente no se encontraron diferencias en la reducción del consumo de alcohol o cocaína, entre el grupo de naltrexona de liberación prolongada inyectable y el grupo placebo (Pettinati et al., 2014). Por otra parte, se han observado resultados positivos de la naltrexona a dosis altas, en el mantenimiento de la abstinencia de alcohol y cocaína, en pacientes tratados con la combinación de **disulfiram-naltrexona**, pero no en los tratados únicamente con naltrexona (Pettinati et al., 2008). En este estudio, el grupo tratado solo con **disulfiram** también tuvo altas tasas de abstinencia a las dos drogas, comparado con el placebo. Grassi et al., en un estudio piloto en pacientes co-dependientes de alcohol y cocaína, observaron una disminución en el consumo de ambas drogas cuando se añadía naltrexona o disulfiram a la terapia cognitivo-conductual, en comparación con la terapia cognitivo-conductual sola (Grassi et al., 2007). Previamente, en pacientes ambulatorios dependientes de cocaína, el disulfiram y la terapia cognitivo-conductual fueron más beneficiosos para quienes no eran dependientes de alcohol o para aquellos que fueron completamente abstinentes de alcohol durante el tratamiento (Carroll et al., 2004). Además, en cuanto a la seguridad del disulfiram, parece que los riesgos del consumo moderado de alcohol y cocaína en sujetos tratados con dosis moderadas de disulfiram,

podrían ser menos problemáticos de lo que algunos piensan (Roache et al., 2011). Teniendo en cuenta todo lo anterior, es evidente que son necesarios más estudios que evalúen la utilidad tanto de la naltrexona (en su dosis-respuesta, por ejemplo) como del disulfiram, en el tratamiento de la co-dependencia de alcohol y cocaína.

En los apartados 6.1 y 6.2 también se ha hecho referencia a la utilidad del *topiramato* en el tratamiento de la dependencia de alcohol y de cocaína, por separado. Dichos datos podrían ser evidencias suficientes para sugerir que el topiramato puede ser un tratamiento eficaz para la dependencia dual de alcohol y cocaína. En esta vía, Kampman y colaboradores realizaron un estudio reciente en sujetos dependientes de alcohol y cocaína, concluyendo que el topiramato no fue mejor que el placebo a la hora de reducir el consumo de ambas drogas ni el *craving* por cocaína. Sin embargo, el topiramato aumentó la probabilidad de retención al tratamiento y de ser abstinentes de cocaína por más tiempo. Los sujetos que parecen haber obtenido más beneficios del topiramato fueron aquellos con síntomas más severos de abstinencia de cocaína (Kampman et al., 2013).

Como se deduce de los apartados previos sobre tratamientos farmacológicos, hay otros compuestos, aparte de la naltrexona, el disulfiram y el topiramato, que han sido evaluados para el tratamiento de la dependencia de alcohol y cocaína. Dichos estudios han puesto de manifiesto los beneficios de cada fármaco en cada una de estas dos dependencias, permitiendo sugerir su eficacia potencial en el caso de la co-dependencia de estas dos drogas.

Algunos de estos fármacos son antidepresivos, como la *desipramina*, la *fluoxetina* y el *bupropion*. Aunque parece que hay pocas evidencias que apoyen el uso clínico de los antidepresivos en el tratamiento de la dependencia de cocaína (Silva de Lima et al., 2010), algunos de ellos han mostrado beneficios en pacientes con depresión comórbida (Kenna et al., 2007; Nunes y Levin, 2004). Otros compuestos, como el *baclofeno* y el *ondansetrón*, parecen mostrar resultados prometedores en el contexto de la dependencia de alcohol y cocaína, pero necesitan, sin embargo, más ensayos clínicos y confirmación de resultados. Algo similar ocurre con la *gabapentina* y con antipsicóticos, como el *aripiprazol* y la *olanzapina*, que no cuentan en este momento con evidencias suficientes que apoyen su uso en la dependencia de estas dos drogas (Amato et al., 2007; Minozzi et al., 2015; para revisión ver Kenna et al., 2007).

7. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y ADICCIÓN

La regulación de la expresión génica es uno de los mecanismos que puede conducir a cambios relativamente estables en las neuronas. De acuerdo con esto, la exposición repetida a una droga de abuso conduciría eventualmente a cambios en la función nuclear y a tasas de transcripción alteradas de determinados genes diana, causando la perturbación repetida de las vías de transducción de señales intracelulares (Kalivas, 2005; Nestler et al., 1993; Nestler y Aghajanian, 1997) (ver Figura 12). La expresión alterada de estos genes daría lugar a alteraciones en la actividad de las neuronas en las que están ocurriendo dichos cambios y, por último, a cambios en los circuitos neurales en los que operan estas neuronas. Como resultado de todo lo anterior se darían cambios estables en la conducta (Nestler, 2001; Ron y Jurd, 2005).

A continuación se hará una breve referencia al papel que representan los genes de expresión temprana (IEGs, del inglés *immediate early genes*), y los principales mecanismos epigenéticos, en la regulación de la expresión génica, así como su relación con la adicción.

7.1. Genes de expresión temprana y adicción

Los IEGs pertenecen a una clase de genes que se activan rápidamente, por lo general de una manera transitoria, en respuesta a cascadas de señalización intracelular inducidas por un estímulo celular. Los IEGs codifican para muchas proteínas funcionalmente distintas, como proteínas de secreción, proteínas del citoesqueleto, quimio-atrayentes, enzimas citoplasmáticas, factores de transcripción dependientes de ligando y factores de transcripción inducibles (familias de proteínas Fos, Jun y Krox) (Herdegen y Leah, 1998; Sng et al., 2004). Los factores de transcripción actúan reconociendo y uniéndose a regiones promotoras de numerosos genes, activando o reprimiendo su transcripción. Algunos lo hacen directamente y otros necesitan combinarse con otros factores. Por ejemplo, las proteínas de la familia Fos pueden heterodimerizar con proteínas de la familia Jun para formar el factor transcripcional AP-1. Este factor transcripcional se une al sitio AP-1, presente en las regiones promotoras de numerosos genes, resultando en la activación o la represión de la actividad transcripcional (Sng et al., 2004; Vilpoux et al., 2009).

Los IEGs, al inducirse rápidamente por la activación sináptica de una neurona, son considerados marcadores de activación neuronal (Chaudhuri, 1997). También se

considera que la expresión transitoria de IEGs está implicada en modificaciones prolongadas de la función celular (Sabban y Kvetnansky, 2001). Así, los factores de transcripción codificados por IEGs están implicados en la regulación de los cambios en la expresión génica que subyacen a la plasticidad neuronal a largo plazo (Nestler et al., 1999). En la Tabla 9 aparece el listado de un grupo de IEGs inducidos por la actividad neuronal.

En las últimas décadas, varios estudios han mostrado que el consumo agudo o crónico de drogas de abuso cambia la expresión de IEGs. Estos genes pueden ser parte de los sustratos neurobiológicos que subyacen a la adicción y, por lo tanto, el mapeo cerebral de la expresión de IEGs inducida por drogas ha sido utilizado para identificar regiones cerebrales que pueden estar implicadas en el desarrollo de tolerancia, sensibilización, *craving*, abstinencia, recaída, y adicción (Vilpoux et al., 2009).

Tabla 9. Subconjunto de genes de expresión temprana

Categoría	Gen	Estructura / función del producto del gen
Factores de transcripción	<i>c-fos</i>	Proteína bZIP; componente del complejo AP-1
	<i>fos B</i>	Proteína bZIP; componente del complejo AP-1
	<i>c-jun</i>	Proteína bZIP; componente del complejo AP-1
	<i>junB</i>	Proteína bZIP; componente del complejo AP-1
	<i>zif268/egr1/krox24/NGFI-A</i>	Proteína con dedos de zinc
	<i>egr2/krox20</i>	Proteína con dedos de zinc
	<i>egr3/pilot</i>	Proteína con dedos de zinc
	<i>nur-77/NGFI-B</i>	Receptor hormonal huérfano
Proteínas postsinápticas	<i>Arc/arg3.1</i>	Regulador del tráfico de AMPAR
	<i>homer 1a/vesl 1s</i>	Forma inducible de proteínas EVH
Señalización intracelular	Rheb	Proteína homóloga de Ras: regulación vía mTOR
	RSG2	Regulador de la señalización de proteínas G heteroméricas
	SNK/PIK2	Quinasa tipo polo
	Cox-2	Ciclooxigenasa inducible
Factores de secreción	BDNF	Miembro de la familia de las neurotrofinas
	Activin β A	Miembro de la superfamilia del TGF- β
	Narp	Pentraxina neuronal: liberada presinápticamente
	tPA	Serina proteasa extracelular
Proteínas de membrana	Arcadin	Proteína de la familia protocadherina
	CPG15/neuritina	Proteína anclada a GPI: promueve la neuritogénesis

* Ver lista de abreviaturas

Modificada de Okuno, 2011

Mientras que los genes neuronales están probablemente regulados por cientos de tipos distintos de factores de transcripción, dos de estos factores, en particular, han sido implicados en la adicción: CREB (del inglés *cyclic-AMP response-element-binding*

protein) y Δ FosB (ver revisión de Nestler, 2001). CREB regula la transcripción de genes que contienen un sitio CRE (*Cyclic-AMP response-element*). Estos sitios se han encontrado en regiones promotoras de casi todos los IEGs neuronales examinados, incluyendo *c-fos*, *bdnf*, *zif268*, *homer1a/ves11s*, *cpg15*, y *Arc*. Por lo tanto, se cree que CREB juega un papel clave en el control de la expresión de IEGs (Okuno, 2011). Por otra parte, Δ FosB, un miembro de la familia Fos, se ha propuesto como responsable de la mayoría de los cambios a largo plazo en la expresión génica implicados en la adicción (Moratalla, 2008).

Además, se ha visto que la administración aguda de varios tipos de drogas de abuso causa una rápida, y transitoria, inducción de varios miembros de la familia Fos (por ejemplo c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) en el NAc y estriado dorsal. Por el contrario, la exposición aguda a drogas induce sólo ligeramente las isoformas modificadas bioquímicamente de Δ FosB (ver Figura 11). Sin embargo, estas isoformas comienzan a acumularse con la administración repetida de la droga debido a su alta estabilidad (Hope et al., 1994; Kelz y Nestler, 2000; Moratalla et al., 1996).

Algunos IEGs, especialmente *Arc* o *zif268* (*Egr-1*), parecen estar altamente correlacionados con actividades neuronales evocadas sensorialmente y conductualmente (Okuno, 2011). *Egr-1* ha sido sugerido como posible marcador de plasticidad sináptica más que de actividad neuronal (Vilpoux et al., 2009; ver revisión de Veyrac et al., 2014).

En la última década, aparte de la categoría de factores de transcripción, las funciones de otros productos codificados por IEGs, tales como proteínas citosólicas y sinápticas, han sido objeto de estudio. Además, algunos IEGs han recibido gran atención dada su implicación directa en las funciones sinápticas (ver Tabla 9). Por ejemplo, la proteína *Arc* es requerida para las formas duraderas de plasticidad sináptica y aprendizaje, e interactúa con dinaminas y con isoformas específicas de endofilinas para aumentar la endocitosis del receptor de membrana (Chowdhury et al., 2006). Por otra parte, el BDNF es un importante regulador de la transmisión sináptica y la LTP en el hipocampo y en otras regiones cerebrales (ver revisión de Leal et al., 2014), contribuyendo, también, a la plasticidad conductual (Cowansage et al., 2010).

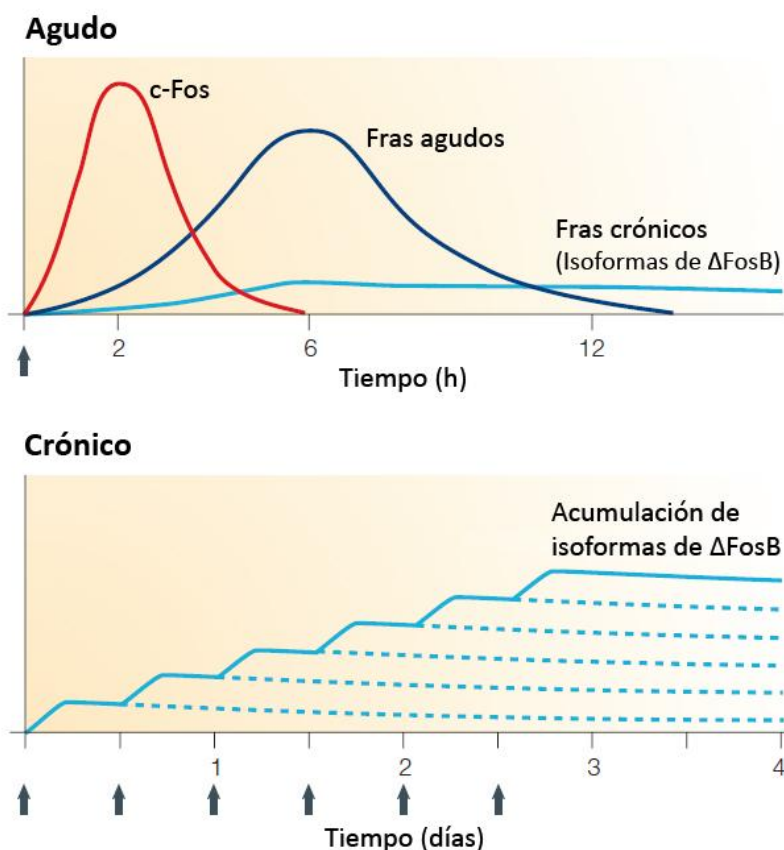


Figura 11. Regulación de Δ FosB por drogas de abuso. El gráfico superior muestra las distintas oleadas de inducción de las proteínas de la familia Fos en el NAc después de una sola exposición (flecha negra) a una droga de abuso. Sin embargo, en el gráfico inferior se observa cómo las isoformas de Δ FosB se mantienen en el cerebro después de la exposición a la droga, acumulándose con las exposiciones repetidas a la misma (modificada de Nestler, 2001).

Loeblich y Nedivi (2009), y Okuno (2011), revisan la función de los principales IEGs, entre los que incluyen los mencionados anteriormente y otros como: Narp (*neuronal activity-regulated pentraxin*), Cox-2 (*cyclooxygenase 2*), Homer1a/ves11s (miembro de una familia de proteínas relacionadas con Homer, derivadas de tres genes distintos), y CPG15 (neuritin; *candidate plasticity gene 15*; *Nrn1*). En apartados posteriores se hará más hincapié en algunos de estos genes, y su papel en la adicción, dada su relevancia en los resultados que van a ser presentados en esta tesis.

7.2. Epigenética

El biólogo Conrad Waddington fue el primero en acuñar el término “epigenética” a mediados del siglo XX. Aunque hay varias definiciones del término, desde un punto de vista general, la epigenética hace referencia a la regulación reversible de la expresión génica, que se produce independientemente de la secuencia del ADN, mediada

principalmente por cambios en la metilación del ADN y la estructura de la cromatina (Jaenisch y Bird, 2003). Berger et al. definen un rasgo epigenético como un fenotipo heredable estable resultante de los cambios en un cromosoma, sin alteraciones en la secuencia del ADN (Berger et al., 2009).

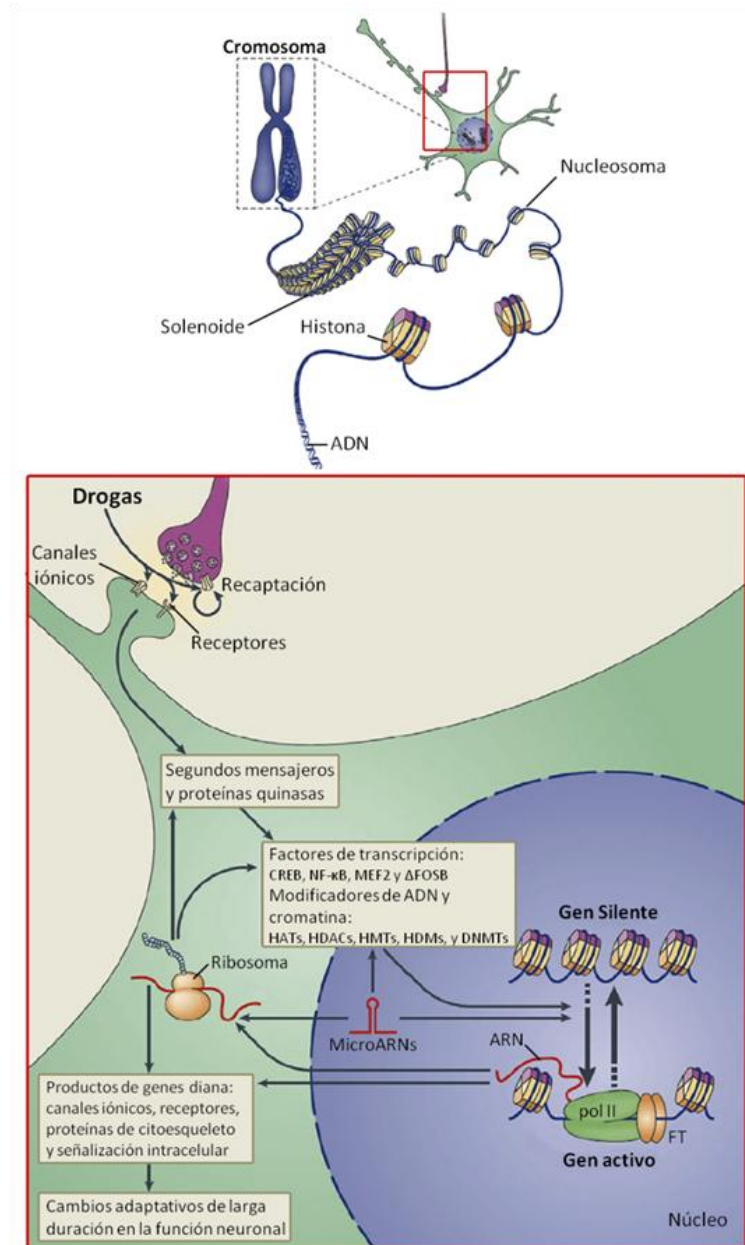


Figura 12. Regulación epigenética por las drogas de abuso. Las drogas de abuso actúan a través de dianas sinápticas para alterar las cascadas de señalización intracelular, lo que conduce a la activación o inhibición de factores de transcripción y de otras proteínas nucleares. Esto lleva a la inducción o represión de genes particulares, incluyendo aquellos para ARNs no codificantes. Se hipotetiza que algunos de estos cambios a nivel de la cromatina, inducidos por las drogas, son muy estables y por tanto subyacen a las conductas duraderas que definen la adicción. DNMTs, ADN metiltransferasas; HATs, histona acetiltransferasas; HDACs, histona desacetilasas; HDMs, histona desmetilasas; HMTs, histona metiltransferasas; MEF2, factor potenciador de miocito-2; NFκB, factor nuclear κB; pol II, ARN polimerasa II (modificado de Nestler, 2014).

En eucariotas el ADN se encuentra organizado y compacto en cromatina en el núcleo. De manera simplificada, la cromatina existe en un estado condensado (heterocromatina), el cual no permite la transcripción de genes, y en un estado activo, abierto (eucromatina), que permite la transcripción de genes individuales. Aunque en realidad la cromatina se encuentra en muchos estados intermedios entre estos dos extremos. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, que en los seres humano consiste de ~147 pares de bases envueltas alrededor de un octámero de histonas. Cada octámero contiene dos copias de las histonas H2A, H2B, H3, y H4 (ver Figura 12). El espaciamiento de los nucleosomas y el grado de condensación de los mismos son controlados por mecanismos epigenéticos, lo que determina la expresión del gen (García et al., 2012; Nestler, 2014).

A continuación se hará una breve referencia a los principales mecanismos de regulación epigenéticos que intervienen en el control de la expresión génica, y al papel que desempeñan los mismos en el campo de la adicción.

7.2.1. Metilación del ADN

La metilación de la citosina, una de las cuatro bases nitrogenadas del ADN, es la modificación epigenética más extendida, mejor entendida y la más estable, que regula la plasticidad transcripcional del genoma de los mamíferos. La metilación del ADN ocurre cuando un grupo metilo es añadido a la posición 5 del anillo de la pirimidina citosina, para producir 5-mC (5-metilcitosina), en una reacción catalizada por un grupo de enzimas llamadas ADN metiltransferasas (DNMTs). Esto ocurre principalmente cuando una citosina (C) aparece junto a una guanina (G) en la secuencia de ADN (C-enlace fosfato-G, o dinucleótido CpG), aunque también se ha descrito metilación de citosina en posiciones no CpG (Wong et al., 2011) [ver Figura 13]. En el genoma hay una escasez del dinucleótido CpG, y estos se pueden agrupar en regiones que se denominan islas CpG (CGIs). Estas CGIs representan el 5% de todos los CpG, y normalmente no están metiladas. El 95% restante de dinucleótidos CpG se encuentran a lo largo del 99% del genoma, y normalmente están metilados (Vinson y Chatterjee, 2012).

Generalmente, la metilación del ADN ejerce un efecto represivo sobre la transcripción de genes, y se considera un cambio epigenético más estable que otros cambios epigenéticos como son las modificaciones de las colas de las histonas, muchas de las cuales se consideran fácilmente reversibles, y que se comentarán más adelante (Nestler,

2014). La metilación de ADN es esencial para regular la expresión génica específica de tejido, el silenciamiento de elementos retrovirales, la impronta genómica, y la inactivación del cromosoma X (Moore et al., 2013).

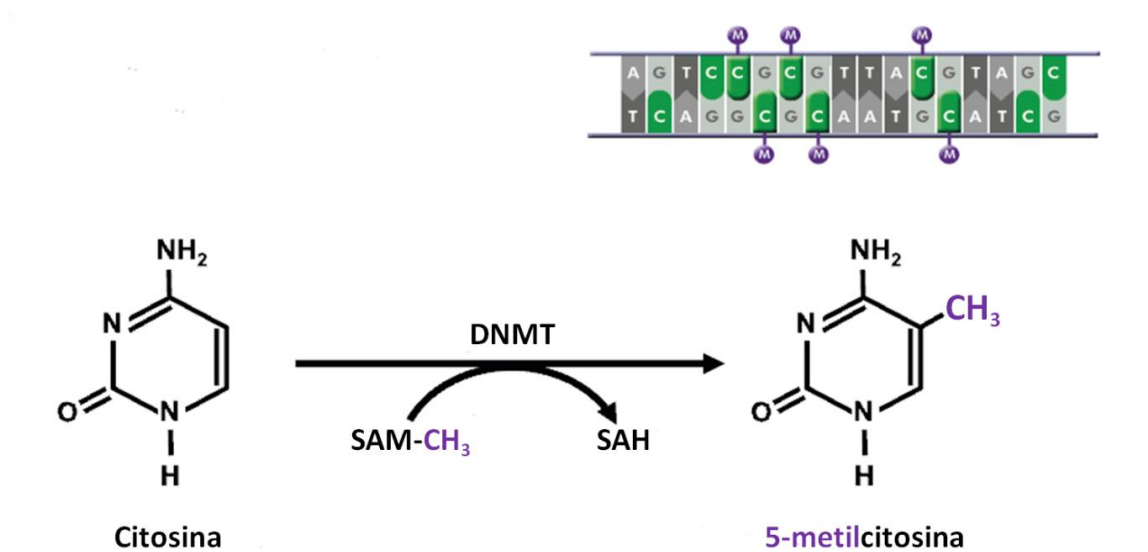


Figura 13. Metilación del ADN. Implica la adición de un grupo metilo en la posición 5 del anillo de la pirimidina citosina, lo que la convierte en 5-metilcitosina. Esta reacción utiliza SAM (S-adenosilmetionina) como donante del grupo metilo, y es catalizada por las enzimas DNMTs. SAH, S-adenosilhomocisteína (modificado de Zakhari, 2013).

La familia de las DNMTs está formada por 4 miembros con funciones distintas: la DNMT3a y la DNMT3b pueden establecer un nuevo patrón de metilación para ADN, y se conocen como DNMTs *de novo* (ver Figura 14A). La DNMT3a es la principal DNMT expresada en el cerebro postnatal. Por otra parte, la DNMT1 (ver Figura 14B) es la encargada, durante la replicación de ADN, de copiar el patrón de metilación desde la hebra de ADN parental a la hebra hija recién sintetizada. Por otro lado, la DNMT3L que se expresa principalmente durante el desarrollo temprano y se restringe en edad adulta a células germinales y timo, no tiene función catalítica por sí misma, pero se asocia con DNMT3a y DNMT3b estimulando su actividad metiltransferasa. DNMT3L se expresa menos durante la diferenciación neuronal, y no se observa en el cerebro postnatal (Moore et al., 2013). En el caso de la DNMT2, ahora llamada Trdmt1 (del inglés *tRNA aspartic acid methyltransferase 1*), es una metiltransferasa homóloga que metila ARN en lugar de ADN. Esta metiltransferasa es la más pequeña en mamíferos, está compuesta únicamente del dominio C-terminal, y no posee la región reguladora N-terminal. Se cree que participa en el reconocimiento del daño del ADN, la recombinación de ADN, y reparación de mutaciones (Subramaniam et al., 2014).

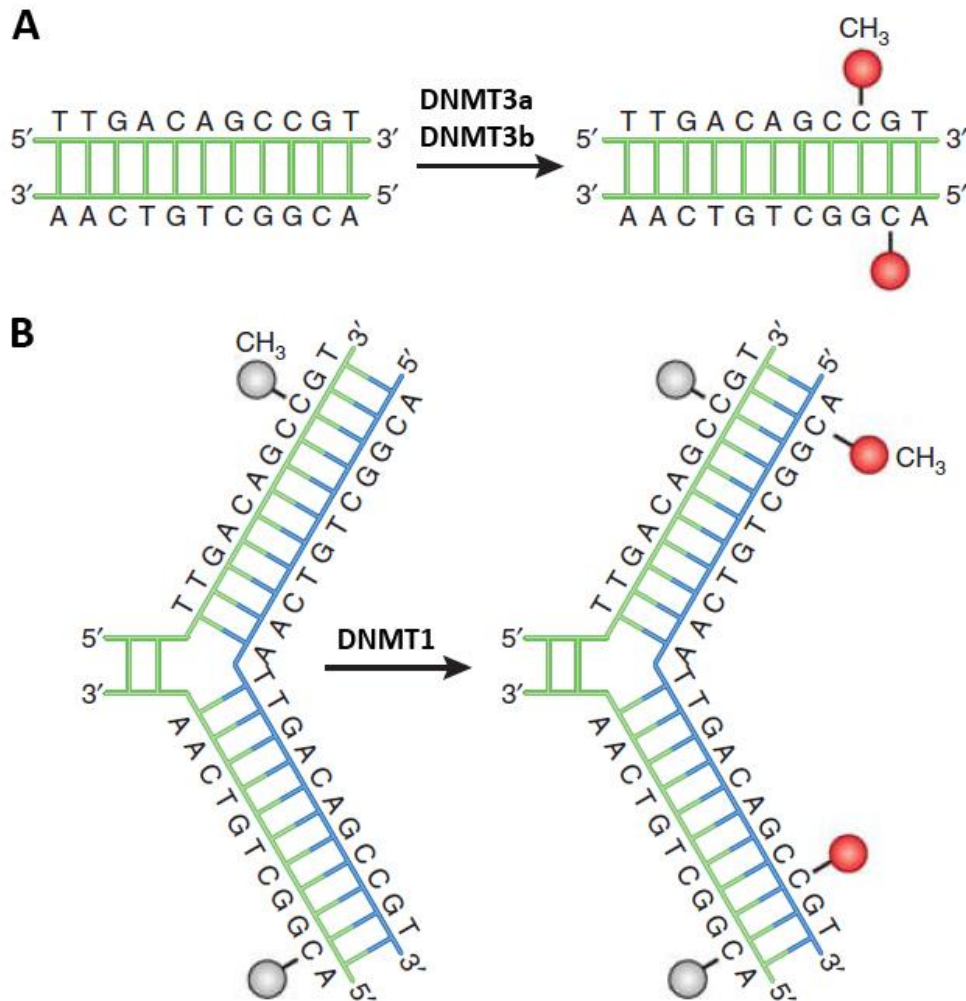


Figura 14. Vías de metilación de ADN. A) DNMT3a y DNMT3b son las DNMTs *de novo* y transfieren grupos metilo (rojo) a ADN desnudo. B) DNMT1 es la DNMT que mantiene el patrón de metilación del ADN durante la replicación. Cuando el ADN se somete a la replicación semiconservativa, la hebra de ADN parental conserva el patrón original de metilación del ADN (gris). DNMT1 replica el patrón de metilación de ADN original añadiendo grupos metilo (rojo) a la hebra hija (azul) recién formada (modificada de Moore et al., 2013).

Por otra parte, la *desmetilación del ADN* puede ser definida como pasiva o activa. La pasiva ocurre en células en división, mientras que la activa puede darse tanto en células que estén en división como en células que estén en interfase. El proceso de desmetilación activa requiere reacciones enzimáticas para procesar la 5-mC, y convertirla de nuevo en una citosina desnuda, mientras que la desmetilación pasiva se produce por inhibición o disfunción de la DNMT1, que es la encargada de mantener el patrón de metilación durante la división celular (Moore et al., 2013).

Hasta ahora, en células de mamíferos, no se conoce ningún mecanismo capaz de romper los fuertes enlaces covalentes presentes entre los grupos metilo y la citosina. La desmetilación se produciría a través de una serie de reacciones químicas que por

desaminación y/o oxidación modifican aún más la 5-mC, generando un producto que es reconocido por la vía de reparación por escisión de bases (BER por sus siglas en inglés). Esta vía que participa en la reparación del ADN, reconoce la base modificada y la reemplaza por otra no modificada o desnuda (Moore et al., 2013).

7.2.2. Histonas

Las histonas son las proteínas básicas alrededor de las cuales se enrolla el ADN para formar nucleosomas. Otro de los mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica es la modulación postraducciona, o cambios que ocurren después de la biosíntesis, de histonas (Wong et al., 2011). Existen varias modificaciones covalentes de histonas, que tienden a ocurrir en las colas N-terminales de las mismas, y que incluyen la acetilación, la sumoilación, o la ubiquitinación en los residuos de lisina, la metilación en los residuos de lisina o arginina, la fosforilación en los residuos de serina o treonina, y la ADP-ribosilación en los residuos de glutamato. Esta diversidad de modificaciones es la base de la “hipótesis del código de histonas”, la cual postula que la suma de estas modificaciones epigenéticas en un gen particular define el estado específico de activación o silenciamiento del gen (Jenuwein y Allis, 2001).

Las diferentes modificaciones de las histonas afectan de forma distinta a la expresión del gen. De esta forma, la acetilación promueve, generalmente, la descondensación de la cromatina incrementando la actividad del gen. Sin embargo, la metilación de histonas y la fosforilación pueden tanto promover como reprimir la transcripción del gen. Respecto a la ubiquitinación, la ADP-ribosilación, y la sumoilación de histonas, aún se desconoce el papel que juegan en esta modulación (Nestler, 2014). Por tanto, las enzimas que median esta variedad de modificaciones covalentes de las histonas, son componentes clave en la regulación general de la expresión génica. Entre estas enzimas se encuentran, por ejemplo: las histona acetiltransferasas (HATs), que catalizan la acetilación y las histona desacetilasas (HDACs) que catalizan la desacetilación (ver Figura 15), mientras que las enzimas que catalizan la metilación y la desmetilación son las histona metiltransferasas (HMTs) y las histona desmetilasas (HDMs), respectivamente (Bártová et al., 2008).

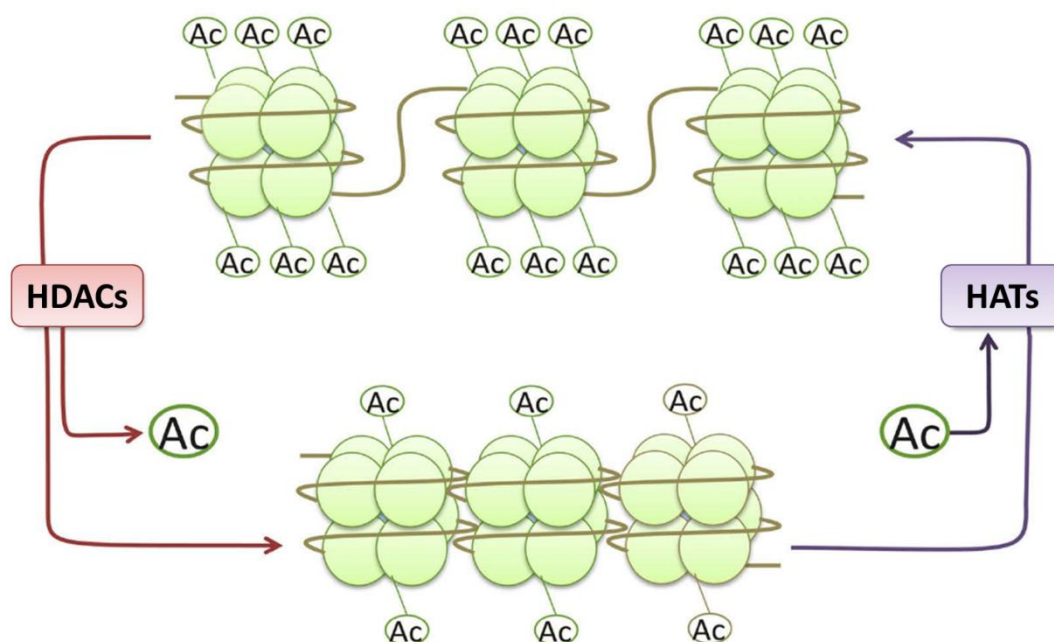


Figura 15. Las histona acetiltransferasas (HATs) transfieren reversiblemente los grupos acetilo (Ac) a las histonas mediante la neutralización de la carga positiva de los residuos de lisina en las colas N-terminales, lo que resulta en una estructura de la cromatina abierta, accesible a factores transcripcionales, y en una activación de la transcripción génica. Por el contrario, la acción de las histona desacetilasas (HDACs) conduce generalmente a la represión transcripcional de genes (modificada de Lu et al., 2015).

Respecto a las HDACs, consideradas co-represores transcripcionales, se han identificado 18 proteínas y son agrupadas en 4 clases: clase I (HDACs 1, 2, 3, y 8); clase IIa (HDACs 4, 5, 7, y 9); clase IIb (HDACs 6 y 10); clase III (Sirtuinas 1-7); y clase IV (HDAC 11) (Lombardi et al., 2011). En cuanto a su distribución en los tejidos, la clase I se encuentra muy distribuida en todos los tejidos, las clases II y IV se localizan principalmente en corazón, músculo esquelético, cerebro, hígado, y riñón; y la clase III se expresa en una gran variedad de tejidos (Dokmanovic et al., 2007; Nogueiras et al., 2012). Los datos sobre la carencia (*knockout*) de diferentes proteínas HDACs de las clases I y II indican que la clase I tiene un papel importante en la supervivencia y proliferación celular, mientras que las HDACs de la clase II pueden tener roles específicos de tejido (Dokmanovic et al., 2007). Por ejemplo, la HDAC1 y HDAC2 son necesarias para el desarrollo cerebral (Jaworska et al., 2015). De manera similar, y como se expondrá más adelante, se ha demostrado la implicación de distintas HDACs en las conductas relacionadas con las drogas de abuso (Nestler, 2014), lo que las hace aún más relevantes para el tema que nos ocupa en esta tesis doctoral.

Es importante destacar que las modificaciones epigenéticas del ADN y de las histonas no son mutuamente excluyentes, si no que interactúan de varias maneras. Por ejemplo, la proteína MeCP2 (del inglés *methyl-CpG-binding protein 2*) se une específicamente a citosinas metiladas, atrayendo HDACs que hipoacetilan histonas e inhiben el acceso de factores de transcripción. Además, un estudio reciente ha mostrado que los residuos de la histona H3 no metilados en la posición de la lisina 4 reclutan DNMTs, dando como resultado una metilación *de novo* del ADN (Ooi et al., 2007; Wong et al., 2011).

7.2.3. ARN no codificante

Otro de los mecanismos de regulación epigenética está mediado por ARN. La secuenciación completa del genoma de los mamíferos y sus productos transcripcionales han revelado un gran número de ARNs expresados que no son traducidos a proteínas. Así, en humanos, alrededor del 50% del ADN genómico se transcribe, el 2% de este es traducido a proteínas y el otro 98% son ARNs no codificantes (ARNnc). Estos ARNnc parecen tener un papel crucial en la regulación de la estructura del ADN, la expresión de ARN, la traducción de proteínas y sus funciones, a través de distintos mecanismos (Dunham et al., 2012; Qi et al., 2006; Rinn y Chang, 2012). Los más estudiados son microARNs (miARNs), que son una clase de moléculas cortas de ARN, de 22 nucleótidos (nt) aproximadamente, y que actúan como reguladores de la expresión génica (Ambros, 2004). Los miARNs se unen a ARNm específicos, pudiendo inhibir su traducción o inducir su desglose. Muchos estudios se han centrado en explorar la relación entre los miARNs y la drogadicción, mostrando que muchos de ellos son regulados al alza o a la baja por las drogas de abuso (Nestler, 2014). Kenny (2014) y Pietrzykowski (2010) revisan este tema en relación con la adicción a drogas específicas como, por ejemplo, la cocaína y el alcohol.

Además, otro tipo de ARN, los ARNs largos no codificantes (ARNlnc), con una longitud > 200 nt, están emergiendo como reguladores clave de la transcripción génica. Estos ARNlnc modularían complejos modificadores de la cromatina a través de interacciones directas con factores de transcripción y otras proteínas nucleares (Nestler, 2014).

7.2.4. Epigenética y adicción

Como se ha comentado con anterioridad, el estriado, en particular el NAc, es un importante sustrato neural para las acciones adictivas de las drogas. Numerosos estudios

han mostrado que la exposición aguda o crónica a una droga de abuso altera la expresión de genes específicos en el estriado, y esta regulación de genes individuales estaría relacionada con las anomalías conductuales que caracterizan la adicción. La longevidad de estas alteraciones conductuales indica que las drogas de abuso causan cambios extremadamente duraderos en el cerebro (Colvis et al., 2005).

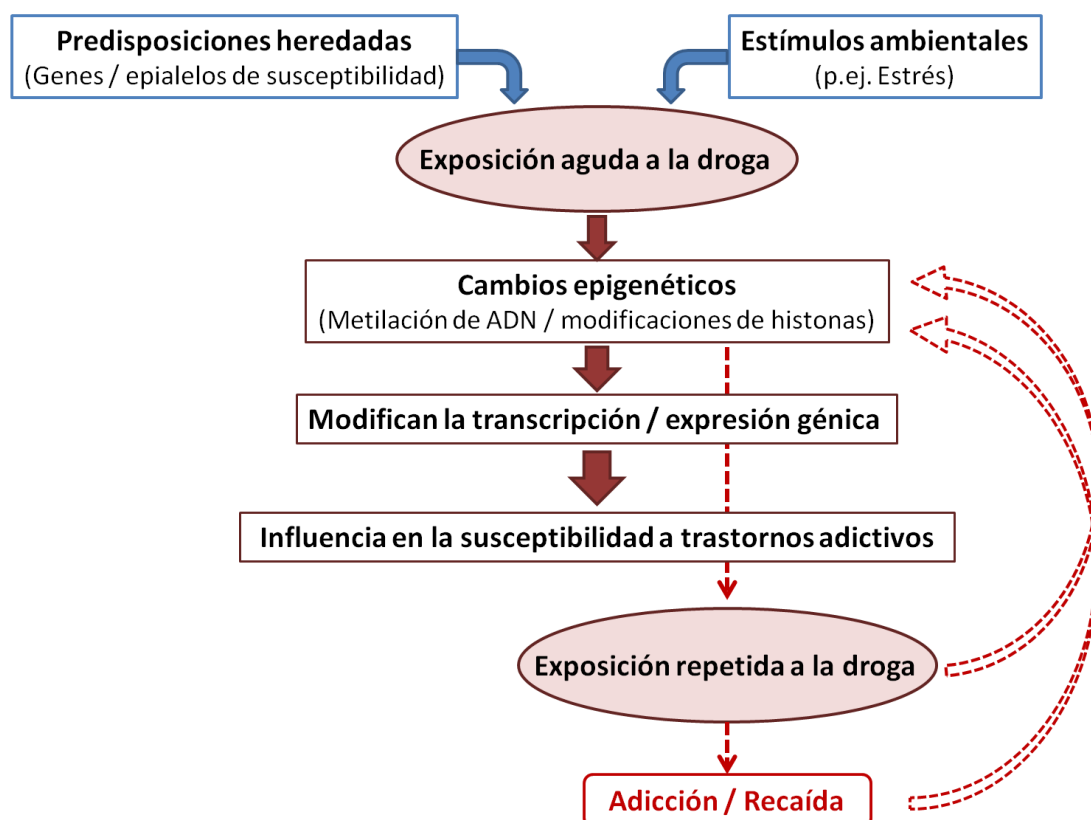


Figura 16. Relación entre las predisposiciones heredadas, los factores ambientales, la exposición a sustancias adictivas, y la vulnerabilidad a los trastornos adictivos. Los individuos portadores de genes o epialelos que los predispongan a conductas adictivas, al ser expuestos a estímulos ambientales adversos, pueden tener un mayor riesgo de desarrollar una adicción. El consumo agudo de una droga puede producir alteraciones en la expresión génica a través de cambios epigenéticos que influyen en la susceptibilidad a trastornos adictivos. La mayor vulnerabilidad a las drogas de abuso retroalimentará el mayor riesgo de consumo futuro de drogas (flecha discontinua), lo que aportaría más modificaciones al epigenoma y la expresión génica (modificado de Wong et al., 2011).

En esta línea, las modificaciones epigenéticas, incluyendo la metilación de ADN y las modificaciones de histonas, juegan un papel regulador esencial en la plasticidad sináptica y la adaptación conductual a largo plazo en el sistema nervioso, lo que justificaría que los cambios epigenéticos sean candidatos probables para el desarrollo de la drogadicción, su mantenimiento, y la recaída al consumo de la droga (Kalivas y O'Brien, 2008; Shaham y Hope, 2005; Wong et al., 2011), pudiendo afectar incluso a la respuesta del individuo a farmacoterapias para las adicciones (Nielsen et al., 2012). En

la Figura 16 se muestra la relación, propuesta por Wong y colaboradores, entre las predisposiciones heredadas, los factores ambientales, la exposición a sustancias adictivas, y la vulnerabilidad a los trastornos adictivos.

Tabla 10. Alcohol: algunas modificaciones epigenéticas

Gen/histona	Tratamiento	Respuesta
NR2B	Crónico	Desmetilación de islas CpG en neuronas corticales de ratón, expresión incrementada de <i>NR2B</i> . La abstinencia incrementó la expresión del gen <i>NR2B</i> , con aumento simultáneo en la acetilación de H3K9 del promotor de <i>NR2B</i> en neuronas corticales primarias.
HDAC	Agudo/crónico	Disminución de la actividad de HDAC, en amígdala de rata, después de la exposición aguda, e incremento con la retirada desde la exposición crónica.
H3K9	Crónico	Incremento de la acetilación de H3K9, de manera dosis-dependiente, en hepatocitos de rata incubados en etanol durante 1 día. La acetilación de H3K9 fue observada con la administración intragástrica crónica en ratas.
PDYN	Crónico	Células de neuroblastoma humano tratadas con acetaldehído mostraron una expresión regulada a la baja del gen <i>PDYN</i> , simultánea con un incremento en la trimetilación de H3K27 y una acetilación disminuida de H3K4 y H3K9 en el promotor de <i>PDYN</i> . Alta expresión de <i>PDYN</i> en la CPF de alcohólicos.
HERP	Crónico	Gen <i>HERP</i> hipermetilado y asociado con niveles incrementados de homocisteína en alcohólicos.
SNCA	Crónico	Hipermetilación del gen <i>SNCA</i> asociada con alcoholismo.
AVP	Crónico	Hipermetilación del gen <i>AVP</i> asociada con alcoholismo.
ANP	Crónico	Hipometilación en la región promotora de <i>ANP</i> observada en alcohólicos.
MAOA	Crónico	Metilación del promotor de la <i>MAOA</i> asociada nominalmente con dependencia de alcohol en mujeres.
NGF	Crónico	Un incremento en la metilación del promotor de <i>NGF</i> debido a la abstinencia en sujetos dependientes de alcohol.
DLK1	Crónico	Región improntada de <i>IG-DMR</i> hipometilada en esperma de sujetos dependientes de alcohol.

* Ver lista de abreviaturas

Modificada de Nielsen et al., 2012

Después de revisar los estudios que relacionan diferentes tipos de modificaciones epigenéticas con la adicción a distintas drogas de abuso, Nielsen et al. (2012) concluyen que los cambios epigenéticos descritos en dichos estudios parecen ser indicativos de una *respuesta epigenética* a la exposición de la sustancia, en lugar de una *predisposición biológica* a desarrollar una adicción. Sin embargo, los estudios sobre los cambios en la metilación del ADN que se observan en la drogadicción sugieren un posible papel de la epigenética en la mayor vulnerabilidad para la adicción.

En las Tablas 10 y 11 se presentan, a modo de resumen, los resultados de varios estudios en los que se exploraron las modificaciones epigenéticas como respuesta a la exposición a alcohol o cocaína, respectivamente. En apartados posteriores de este

manuscrito se expondrán y discutirán algunos de los resultados específicos más importantes en esta área, bajo el encuadre de los estudios con estas dos drogas que forman parte de esta tesis.

Tabla 11. Cocaína: algunas modificaciones epigenéticas

Gen/histona	Tratamiento	Respuesta
<i>c-fos</i>	Agudo	Incremento en la acetilación de la histona H4 en el promotor de <i>c-fos</i> , y aumento de la expresión del gen, en el estriado de ratón. Acumulación de la HDAC1 reclutada por FosB en el promotor de <i>c-fos</i> para limitar la expresión de <i>c-fos</i> .
<i>FosB</i>	Agudo/crónico	Hipometilación y disminución de la unión de MeCP2 en el promotor de <i>FosB</i> , e incremento en la expresión de <i>FosB</i> en el núcleo accumbens. La cocaína crónica reclutó la proteína de unión a CREB para el promotor de <i>FosB</i> , lo que reguló al alza la expresión de <i>FosB</i> en el estriado, para aumentar la sensibilidad a la cocaína y la actividad locomotora.
HDAC5	Crónico	La cocaína disminuyó la actividad de HDAC5 en el núcleo accumbens, lo que incrementó la transcripción de los genes diana de HDAC5.
<i>CaMKIIa</i>	Crónico	Incremento de la acetilación de la histona H3 en el gen <i>CaMKIIa</i> , y expresión regulada al alza.
<i>DNMT1, Dnmt3a y Dnmt3b</i>	Agudo	Expresión inducida por cocaína de <i>Dnmt3a</i> y <i>Dnmt3b</i> en el núcleo accumbens. La exposición materna a cocaína incrementó la expresión de <i>DNMT1</i> y <i>DNMT3a</i> , pero no de <i>DNMT3b</i> , en las neuronas piramidales hipocámpales de la descendencia.
MeCP2	Agudo	Incremento en la fosforilación de MeCP2 en la serina 421, en el estriado de rata. La fosforilación de la serina 421 controla la capacidad de MeCP2 de regular el patrón dendrítico, la morfogénesis de espinas, y la inducción de la transcripción de <i>Bdnf</i> dependiente de la actividad.
<i>Cdk5</i>	Crónico	Acetilación de la histona H3 en el promotor de <i>Cdk5</i> en el estriado.
<i>Bdnf</i>	Crónico	Acetilación de la histona H3 en el promotor de <i>Bdnf</i> , e incremento de <i>Bdnf</i> en el hipocampo.
miR-212	Crónico	Señalización de CREB amplificada en el estriado, vía fosforilación de Raf-1, aumentando la sensibilización de la adenilato ciclasa.

* Ver lista de abreviaturas

Modificada de Nielsen et al., 2012

Haciendo referencia a la acetilación de histonas, se ha visto, por ejemplo, que tras la exposición aguda o crónica a cocaína aumentan los niveles globales de acetilación de las histonas H3 y H4 en el NAc, pero a pesar de este incremento global muchos genes muestran la acetilación de histonas disminuida después de la exposición crónica a esta droga (Robison y Nestler, 2011). También se ha observado que la sobreexpresión de HDAC4 o HDAC5 disminuye las respuestas conductuales a cocaína, mientras que la carencia de HDAC5 hipersensibiliza a los ratones a los efectos crónicos de la droga (Kumar et al., 2005; Renthal et al., 2007). Por otra parte, la abstinencia de alcohol en ratas incrementa la actividad de las HDACs y reduce la acetilación de histonas en la amígdala (Pandey et al., 2008). En un estudio reciente se encontró un incremento de la expresión de HDACs en sangre periférica tras la exposición repetida a alcohol, tanto en

ratas como en humanos, sugiriendo distintos patrones de expresión dependiendo del tipo de exposición -aguda o crónica- (López-Moreno et al., 2015), lo que apoyaría la posibilidad de su uso como biomarcador en los trastornos por consumo de sustancias.

En los últimos años, la investigación con moléculas inhibidoras de las HDACs, que dan lugar a un aumento de la acetilación de histonas, ha sido bastante fructífera. Estos inhibidores han demostrado efectos sobre diferentes conductas relacionadas con el alcohol, como son el consumo del mismo, la sensibilización motora, la ansiedad asociada a la abstinencia, entre otras (Ponomarev, 2013). Además, la administración a corto plazo de inhibidores inespecíficos de las HDACs potencia el condicionamiento de lugar y las respuestas locomotoras de psicoestimulantes y opiáceos (Kumar et al., 2005; Renthall et al., 2007), pero si esta inhibición es más prolongada los cambios podrían ser en la dirección opuesta (Kim et al., 2008; Romieu et al., 2008).

Por otra parte, la metilación de histonas también es regulada directamente por las drogas. Así, el abuso crónico de alcohol en humanos puede dar lugar a un incremento global, y en genes específicos, de tri-metilación de la histona 3 en la lisina 4 (H3K4me3), en la corteza cerebral (Ponomarev et al., 2012), mientras que la exposición crónica a cocaína reduce los niveles de H3K9me2 (di-metilación de la histona 3 en la lisina 9), así como los de H3K9me3 (tri-metilación de la histona 3 en la lisina 9), una marca de heterocromatina, en el NAc (Maze et al., 2011). De manera similar, tanto la cocaína como el alcohol disminuyen los niveles de expresión de la proteína G9a, una HMT, en el NAc y en neuronas corticales cultivadas respectivamente. Esta disminución de G9a en el NAc incrementa la arborización dendrítica en las neuronas de esta estructura y es asociada con el incremento de la expresión de varias proteínas implicadas en la función sináptica (Nestler, 2014).

Respecto a la metilación del ADN, distintos estudios han mostrado que la exposición a la cocaína altera los niveles de expresión de la DNMT3a en el NAc (Anier et al., 2010; LaPlant et al., 2010). De manera similar, la reducción de las DNMTs (por ej. con inhibidores) en esta estructura incrementa las respuestas conductuales a la cocaína, mientras que la sobreexpresión de la DNMT3a en la misma área tiene efectos opuestos (LaPlant et al., 2010). Por otro lado, la exposición crónica a cocaína incrementa la expresión de MeCP2 en el estriado dorsal, donde a su vez, la disminución de esta proteína provoca una reducción de la autoadministración de la droga (Im et al., 2010).

Igualmente, los niveles de metilación del ADN en las regiones promotoras de distintos genes se han visto alterados en pacientes dependientes de alcohol. Entre los genes afectados se encuentran los del receptor μ opioide, la proopiomelanocortina (*POMC*), y el *DAT*, así como algunos de los incluidos en la Tabla 10. Sin embargo, mientras varios de estos estudios muestran una hipermetilación en los pacientes dependientes de alcohol, otros encuentran una hipometilación de la región del gen investigada (Nieratschker et al., 2013; Zhang et al., 2013), lo que pone de manifiesto la necesidad de más estudios al respecto.

Por último, se debe destacar que el campo de la investigación en epigenética de la drogadicción es relativamente nuevo, por lo que quedan muchas preguntas pendientes, dianas de futuros estudios, acerca de los mecanismos epigenéticos concretos implicados en las distintas etapas de la adicción, así como sobre las estructuras/tejidos y genes específicos que se ven afectados, teniendo en cuenta otras variables genéticas y ambientales que puedan influir en esta regulación epigenética.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

En la presente tesis doctoral quisimos verificar varias hipótesis respecto a la interacción entre el alcohol y la cocaína, la eficacia de diferentes tratamientos farmacológicos en la dependencia dual de estas drogas, así como la implicación de la CPF. Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

- 1) El tratamiento farmacológico con naltrexona, acamprosato, y topiramato será efectivo en la reducción del consumo de alcohol en ratas.
- 2) La exposición crónica a cocaína aumentará el consumo de alcohol y alterará la actividad locomotora de los animales.
- 3) El tratamiento farmacológico con naltrexona y topiramato reducirá el incremento del consumo de alcohol y la estimulación psicomotora inducidos por cocaína.
- 4) La naltrexona y el topiramato alterarán la expresión de genes asociados con la actividad neuronal y genes epigenéticos en la CPF.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudio de la curva dosis-respuesta del tratamiento farmacológico con acamprosato, naltrexona, y topiramato en el consumo de alcohol en ratas (*Artículos 1 y 2*).
- 2) Estudio de los efectos de la administración crónica de cocaína, mediante una curva dosis-respuesta, sobre la autoadministración operante de alcohol (*Artículos 1 y 2*).
- 3) Exploración de los efectos del tratamiento con naltrexona, topiramato, y cocaína sobre la actividad locomotora de los animales (*Artículos 1 y 2*).
- 4) Evaluación de la efectividad del tratamiento con naltrexona y topiramato en la reducción del consumo de alcohol en animales tratados concomitantemente con cocaína (*Artículos 1 y 2*).
- 5) Exploración de los efectos del tratamiento con naltrexona y topiramato sobre la sensibilización motora inducida por cocaína (*Artículos 1 y 2*).

- 6) Análisis de las alteraciones inducidas por el tratamiento crónico con naltrexona y la interacción alcohol/cocaína sobre la expresión de varios IEGs, incluyendo factores de transcripción y genes efectores, en la CPF (*Artículo 1*).
- 7) Análisis de los efectos del tratamiento crónico con topiramato sobre el metabolismo del alcohol y de la cocaína (*Artículo 2*).
- 8) Exploraciones de las alteraciones en la memoria episódica producidas por el tratamiento agudo o crónico con topiramato (*Artículo 2*).
- 9) Estudio de los efectos del tratamiento crónico con topiramato y la interacción alcohol/cocaína sobre la expresión de varios grupos de genes relacionados con mecanismos de regulación epigenética, proteínas diana del topiramato, y el sistema de recompensa, en la CPF (*Artículo 2*).

III. RESULTADOS

ARTÍCULO 1

Echeverry-Alzate *et al.*, 2012. Cocaine reverses the naltrexone-induced reduction in operant ethanol self-administration: The effects on immediate-early gene expression in the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology*. **63(6):927-35.**
Impact Factor (2014): 5.106



Cocaine reverses the naltrexone-induced reduction in operant ethanol self-administration: The effects on immediate-early gene expression in the rat prefrontal cortex

Víctor Echeverry-Alzate^a, María Tuda-Arízcan^a, Kora-Mareen Bühler^a, Ángel Santos^b, Elena Giné^b, Pedro Olmos^{a,c}, Miguel Ángel Gorriti^a, Evelio Huertas^d, Fernando Rodríguez de Fonseca^e, Jose Antonio López-Moreno^{a,*}

^a Department of Psychobiology, Faculty of Psychology, Campus de Somosaguas, Complutense University, 28223 Madrid, Spain

^b Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

^c C.I.E.M.A.T., Avda. Complutense 22, Madrid, Spain

^d Department of Basic Psychology, Campus de Somosaguas, Complutense University, 28223 Madrid, Spain

^e Fundación IMABIS, Laboratorio de Medicina Regenerativa, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, 29010 Málaga, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 February 2012

Received in revised form

19 May 2012

Accepted 7 June 2012

Keywords:

Naltrexone

Acamprosate

Prefrontal

C-fos

COX-2

Genetic expression

ABSTRACT

Naltrexone is a clinically approved medication for alcoholism. We aimed to investigate the effectiveness of naltrexone co-administered with cocaine and the association of these substances with immediate-early gene expression in the rat prefrontal cortex. We used chronic operant ethanol self-administration and oral treatments prescribed for alcoholism and available in pharmacies to maximise the predictive validity in humans. We performed real-time PCR analysis to determine gene expression levels in the prefrontal cortex. Only the highest dose of naltrexone (1, 3, and 10 mg/kg, p.o.) reduced the response to ethanol. Cocaine increased ethanol self-administration in a dose-dependent manner (2.5, 10, 20 mg/kg, i.p.) and reversed the naltrexone-induced reduction. Naltrexone failed to prevent the cocaine-induced increase in locomotor activity observed in these animals. Chronic self-administration of ethanol reduced the expression of the C-fos gene 4- to 12-fold and increased expression of the COX-2 (up to 4-fold) and *Homer1a* genes in the rat prefrontal cortex. Chronic ethanol self-administration is prevented by naltrexone, but cocaine fully reverses this effect. This result suggests that cocaine may overcome naltrexone's effectiveness as a treatment for alcoholism. The ethanol-induced reduction in C-fos gene expression in the prefrontal cortex reveals an abnormal activity of these neurons, which may be relevant in the compulsive consumption of ethanol, the control of reward-related areas and the behavioural phenotype of ethanol addiction.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Alcoholism is a disabling addiction disorder (WHO, GISAH, 2011). An effective treatment for alcoholism remains elusive despite the advances that have been made including the development of naltrexone (i.e., Antaxone®) and acamprosate (i.e., Campral®), two clinically approved medications to treat binge ethanol consumption, ethanol abuse and dependence and to prevent relapse (Fuller and Gordis, 2001; Johnson, 2010; Mason, 2003; O'Brien et al., 1996;

Spanagel and Zieglängsberger, 1997). Treatment with oral naltrexone has been associated with a significant reduction in alcohol-related healthcare costs (Kranzler et al., 2010). Naltrexone is a non-selective opioid antagonist theorised to reduce ethanol consumption by blocking central opioid receptors that subsequently directly or indirectly modulate the effects of ethanol (Hillemacher et al., 2011; Hubbell and Reid, 1990). The mechanism of action of acamprosate is less well understood. Acamprosate is hypothesised to reduce neuronal hyperexcitability through its putative agonist-like effects at GABA receptors and its antagonist effects at the glutamate N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor (Kiefer and Mann, 2010; Littleton, 1995; Stromberg et al., 2001). The effects of combining the two compounds on ethanol consumption have also been assessed. Stromberg et al. (2001) reported no evidence of an additive or synergistic effect resulting from such a combination nor

* Corresponding author. Laboratorio de Psicobiología, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Campus Somosaguas, Universidad Complutense de Madrid, E-28223 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3943093; fax: +34 91 3943189.

E-mail address: jalopezm@psi.ucm.es (J.A. López-Moreno).

was it more effective than naltrexone alone in reducing ethanol consumption by rats.

The co-abuse of ethanol and cocaine occurs with high frequency and persistence in human populations worldwide. For example, Miller et al. (1989) reported that 94% of the American patients diagnosed as cocaine-dependent were also diagnosed with an ethanol dependence. In another study, approximately 12 million members of the general population had used both ethanol and cocaine within the previous twelve months (Grant and Harford, 1990). In a more recent study in Europe, 64% of the cocaine powder users (excluding crack cocaine users) reported frequent ethanol consumption (Gossop et al., 2006), and the concomitant use of ethanol was evident by analyses of blood and urine samples in 76% of cocaine-related cases of sudden death (Lucena et al., 2010). Finally, heavy chronic alcohol use is linked to a three-fold increased risk of cocaine use (Kulaga et al., 2010). These data support the idea that cocaine use could increase the vulnerability to the development of ethanol dependence (Rubio et al., 2008) and vice versa. A careful examination of the clinical data indicates that the concurrent use of ethanol and cocaine is associated with increased mortality and morbidity resulting from cerebro- and cardiovascular complications (Cami et al., 1998; O'Connor et al., 2005; Randall, 1992; Vroegop et al., 2009) as well as hepatotoxicity and compromised mental status (Odeleye et al., 1993; Vanek et al., 1996). Taken together, these facts underscore the urgency and necessity to develop pharmacotherapeutic interventions for alcoholism and the comorbidity of alcoholism with cocaine use.

Currently, despite the increasing number of studies investigating the effects of naltrexone or acamprosate on ethanol/cocaine co-consumption (Hersh et al., 1998; Oslin et al., 1999; Pettinati et al., 2008a, 2008b; Sable et al., 2004; Schmitz et al., 2004, 2009; Stromberg et al., 2002; Suh et al., 2008), knowledge in this area remains incomplete. For example, a high dose of naltrexone modestly reduced heavy ethanol consumption in individuals dependent on both cocaine and ethanol (Schmitz et al., 2009). Therefore, the aim of this study was to gain deeper knowledge regarding the treatment of alcohol addiction with naltrexone and acamprosate when cocaine is co-administered. For this purpose, we used chronic operant ethanol self-administration in rats, an animal model with one of the highest levels of predictive validity in humans (Koob et al., 2003) for the development of pharmacological treatments for substance abuse disorders. Furthermore and important in this study, we investigated the expression of immediate-early genes as biomarkers of neural stimulation in the prefrontal cortex.

We focused on the prefrontal cortex because of its contribution to addictive behaviour (Lüscher and Malenka, 2011), its involvement in compulsive ethanol drinking, its demonstrated sensitivity to naltrexone and acamprosate treatment (Burattini et al., 2008; Li et al., 2010; Yu et al., 2011), and its critical role in integrating and regulating cognitive behaviour in rodents and in humans (e.g., Abernathy et al., 2010; Dayas et al., 2007; Vengeliene et al., 2009).

2. Methods

2.1. Subjects

Ninety-two male Wistar rats (Harlan, Barcelona, Spain) weighing 375–425 g at the start of the pharmacological experiments were housed in groups of 4 per cage in a temperature- and humidity-controlled environment on a 12 h reverse light/dark cycle (lights off at 07:00 h). Experimental sessions were performed during the dark phase (Fig. 1). Food and water were available ad libitum except as specified below. All research was conducted in strict adherence to the European Community Council Directive (91/414/EEC). All efforts were made to minimise animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.2. Drugs

Ethanol solution was prepared daily as a 10% ethanol v/v solution from 99% ethanol. Acamprosate (3-Acetamidopropane-1-sulfonic acid, Campral®, Merck Santé S.A.S., Lyon, France) and naltrexone (17-(Cyclopropylmethyl)-4,5 α -epoxy-3,14-dihydroxymorphinan-6-one, Antaxone®, Pharmazam S.A., Barcelona, Spain) were dissolved in water and administered by oral gavage (p.o.) at a volume of 3 ml/kg. Cocaine hydrochloride (Sigma–Aldrich Co., U.S.A.) was dissolved in physiological saline and injected intraperitoneally at a volume of 1 ml/kg.

2.3. Ethanol self-administration and motor experiments

2.3.1. Apparatus and procedure

The ethanol operant sessions were conducted in modular chambers enclosed in sound-attenuating cubicles (Letica, LE 850 model; Panlab, Barcelona, Spain and Med Associates Inc., St. Albans, VT, USA). The association of visual or auditory cues with lever presses or dipper presentations was avoided. The exhaust fans were inactivated because they increase the rate of ethanol evaporation. The chambers were equipped with two retractable levers located 7 cm above a grid floor on either side of a drinking reservoir positioned in the centre of the front panel of the chamber and 4 cm above the grid floor. The levers were counterbalanced to respond as the active lever (delivering 0.1 ml) or as the inactive lever. The contents of the dipper were accessible to the animal until the next lever press, at least 2.5 s later, to avoid measuring dipper presentations as lever presses.

Training was conducted using a modification of the method used by López-Moreno et al. (2004). Briefly, the rats were placed on a restricted water intake schedule ranging from 2 to 4 days to facilitate the training in lever pressing. The length of the water restriction depended on the animal's rate of learning; animals that did not learn the first or second day were restricted for 4 days. During the first 4 days of training, 76 animals received a 1% saccharin solution in the dipper. Thereafter, the following sequence was followed on a fixed-ratio schedule of

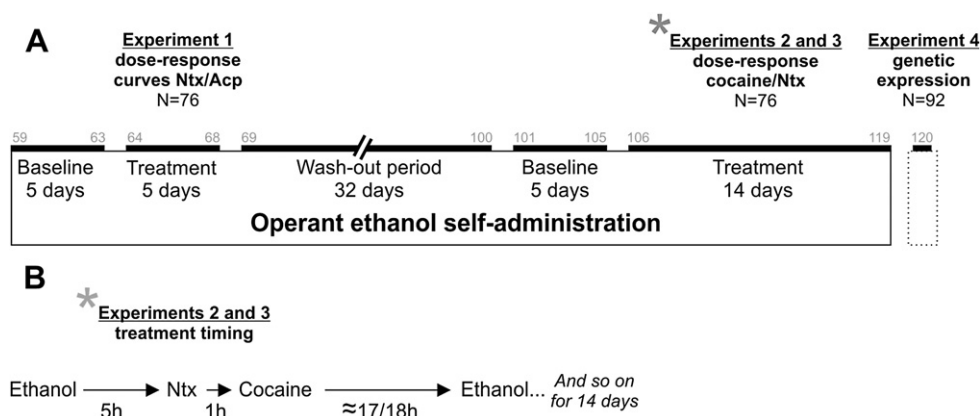


Fig. 1. A brief schematic representing the protocol used. Panel A, naltrexone and acamprosate were administered for 5 consecutive days 1 h before the operant ethanol self-administration session (experiment 1). After a wash-out period, experiments 2 and 3 were conducted for 14 consecutive days. On the 15th day, the animals were sacrificed by decapitation for RTqPCR experiments at the time that they would have been placed in the ethanol operant chamber (experiment 4). A group of 16 rats responding to saccharin were used as the calibrator group. The numbers in grey indicate the cumulative number of operant ethanol sessions. Panel B shows the details of the treatment schedule of experiments 2 and 3. Ntx = Naltrexone; Acp = Acamprosate.

reinforcement: 0.2% saccharin for three sessions, 0.2% saccharin and 0.2% ethanol for three sessions, 0.16% saccharin and 2% ethanol for three sessions, 0.12% saccharin and 4% ethanol for three sessions, 0.08% saccharin and 6% ethanol for three sessions, 0.04% saccharin and 8% ethanol for three sessions, 0.02% saccharin and 10% ethanol for three sessions and 10% ethanol for the remaining sessions. An additional group of 16 animals that had access only to saccharin and did not receive any pharmacological treatment during the study was used as the control group for the genetic expression experiment (the calibrator group). The baseline (obtained at day 0) corresponded to the average number of ethanol responses obtained on the final 5 days before the first experiment (from the 59th day to the 63rd day); the number of responses varied by 15% or less. All the ethanol operant sessions lasted 30 min under a fixed-ratio 1 schedule for the entire study.

The locomotor activity of the rats was assessed using 6 custom-made 40 × 35 × 35 cm rectangular boxes; the boxes were equipped with 8 photocells arranged in 2 lines (4 and 8 cm above the floor) that detected the locomotor activity as beam breaks. The animals were evaluated in a counterbalanced manner during a four-day period and in a single 20 min trial immediately following an injection with cocaine or the vehicle. The horizontal and rearing activity of the rats was recorded.

2.3.2. Experiment 1: the effects of subchronic treatment with naltrexone or acamprosate on the response to ethanol

Experiment 1 was designed to identify which drug (naltrexone or acamprosate) more efficiently reduced ethanol self-administration and to select one of the drugs for further behavioural studies concerning alcohol/cocaine co-administration. To this end, we evaluated the effects of varying doses of naltrexone (0, 1, 3 and 10 mg/kg, p.o.) and acamprosate (0, 35, 75, and 210 mg/kg, p.o.) on the number of limited-access responses to ethanol. Naltrexone and acamprosate were dissolved in water and administered by oral gavage 60 min prior to the ethanol operant session daily for 5 consecutive days. The route of administration (p.o.) was chosen to strengthen the ecological validity of the study because it most closely resembled the setting for human patients. The rats were deprived of food 12 h prior to the pharmacological treatment (naltrexone/acamprosate); because the medications were orally administered, the food deprivation was intended to improve the drugs' rate of absorption and normalise the absorption among the animals. The animals were matched and distributed among groups according to the number of ethanol responses they had exhibited at baseline.

2.3.3. Experiment 2: the effects of the chronic administration of cocaine, naltrexone and both co-administered on the response to ethanol

Experiment 2 was designed to evaluate the effects of varying doses of cocaine alone or in combination with 10 mg/kg naltrexone (p.o.) on operant ethanol self-administration. After experiment 1 (see Fig. 1a), the animals continued with daily ethanol operant sessions for an additional 32 days without receiving any treatment; this period was termed the wash-out period. A new five-day baseline was established by noting that lever presses varied less than 15% within these five days, and the rats were counterbalanced based on their response to the previous treatments. The rats were again matched and distributed into each group according to the number of ethanol responses each had exhibited. In this experiment, the rats received the following treatments for 14 consecutive days: (a) the vehicle group was orally treated with water and then injected with saline; (b) the cocaine groups were treated orally with water and with 2.5, 10 or 20 mg/kg, i.p. cocaine and (c) the naltrexone groups were treated with naltrexone alone (10 mg/kg, p.o.) or with

a combination of 10 mg/kg naltrexone administered orally + 10 mg/kg, i.p. cocaine or 10 mg/kg naltrexone + 20 mg/kg, i.p. cocaine. The treatment schedule is depicted in Fig. 1b.

2.3.4. Experiment 3: the effects of cocaine and naltrexone and their co-administration on locomotor activity

In this experiment, we aimed to evaluate whether naltrexone would prevent cocaine-induced motor sensitisation. As described above, naltrexone was administered 1 h before the administration of cocaine to the animals treated with a combination of naltrexone and cocaine (Fig. 1b).

2.4. Genetic expression experiments

2.4.1. Apparatus and procedure

Real-time PCR was performed using a LightCycler 480-II machine (Roche) with primers and assays designed by the Universal Probe Library (UPL) from Roche (see Table 1). A 10-fold dilution series of the template was employed to amplify every gene to validate the efficiency of each assay and to confirm that the amplification efficiencies of the target and reference genes were comparable (indicated by a near-zero slope value for both the target and reference genes). The 18S ribosomal RNA gene was used as an internal control for normalisation. The saccharin-vehicle group (the non-ethanol-treated group) was used as a calibrator (an untreated control), and the 2- $\Delta\Delta C_T$ method was used to analyse the expression data (Schmittgen and Livak, 2008).

The prefrontal cortex, including the frontal association cortex and the more rostral/anterior regions of the lateral–ventral–dorsal–medial areas of the orbital cortex, prelimbic cortex and secondary motor cortex (Paxinos and Watson, 1998 for rats), was immediately dissected on ice and quickly frozen on dry ice at -80°C . Total RNA was isolated from the prefrontal cortex of each rat using Tripure Isolation Reagent (Roche) and stored at -80°C . One microgram of total RNA was reverse transcribed into cDNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche).

2.4.2. Experiment 4: the effects of ethanol, cocaine and naltrexone on the immediate-early gene expression in the prefrontal cortex

The goal of experiment 4 was to map the brain prefrontal activity related to our behavioural results. For this purpose, we assessed the immediate-early gene expression of two regulatory transcription factors (*C-fos* and *Zif-268*) and five effector immediate-early genes (*Bdnf*, *Arc*, *Homer1a*, *Rheb* and *COX-2*). To maximise the association between the prefrontal activity and the animal's state before the operant ethanol session, the animals were sacrificed rapidly by decapitation during the period they would have been placed into the ethanol operant chamber for the 15th day of ethanol operant self-administration (see Fig. 1a).

2.5. Statistical analysis

The data from the two first experiments were analysed using a one-way ANOVA with treatment as the between-subject factor followed by Tukey's post hoc test. A two-way ANOVA (cocaine × naltrexone as the between-subject factors) was used to analyse the data from the third experiment. Similarly, a two-way ANOVA (gene × treatment as the between-subject factors) was used for the fourth experiment, but in this case, the Bonferroni post hoc test was used because of the greater number of multiple comparisons. After confirming the significant main effects by ANOVA,

Table 1

Details of the primers used and cycle numbers required to reach the crossing point (threshold) in the saccharin group in the prefrontal cortex.

Gene	Name	GenBank accession no.	Direction	Primer sequence (5'–3')	Amplicon length (nt)	Mean cycles (Cp) saccharin group	SEM
18S	18S ribosomal RNA gene	M11188.1	Left	GGAGCCTGAGAAACGGCTA	64	9.42	0.10
Rheb	Ras homologue enriched in brain	NM_013216.1	Right	TCGGGAGTGGGTAATTTGC	64	23.80	0.24
			Left	TCAGACTGCTGTGGATGTTTT			
Zif-268	Transcription factor Zif268	ENSRNOT00000026303	Right	AGCCGCTCCGTCAATCTT	90	23.83	0.15
			Left	ACGAGCACTGACCAACAGA			
C-fos	Proto-oncogene c-Fos	ENSRNOG00000008015	Right	GGGTAGTTTGGCTGGGATAAC	60	24.91	0.21
			Left	ACCTCAAGGACTTGAAGCATC			
Homer1	Homer homologue 1	NM_031707.1	Right	ACATCTCCGGAAGAGGTGAG	72	24.92	0.11
			Left	TGCACAGCCACAAGACAGA			
Arc	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	NM_019361.1	Right	CCTCTCTCTTTACTTTTGGGCTC	64	25.60	0.16
			Left	GCTGAAGCAGCAGACCTGA			
COX-2	Cyclooxygenase-2	S67722.1	Right	TTCCTGGTATGAATCACTGCTG	118	28.30	0.21
			Left	ACCAACGCTGCCACAAC			
Bdnf	Brain-derived neurotrophic factor	NM_012513.3	Right	GGTTGGAACAGCAAGGATTT	66	28.31	0.12
			Left	AGCGCAATGTGTGTAGTGGT			
			Right	GCAATTGTTTGCTCTTTTCT			

A sample's "Crossing Point" (Cp) depends on the initial concentration of cDNA in the sample. Samples with a lower initial concentration of target DNA require more amplification cycles to reach the Cp. A sample with a higher concentration requires fewer cycles. The quantity of DNA doubles every cycle, and 3.32 cycles represent a 10-fold increase assuming 100% PCR efficiency.

a significance level of $p < 0.05$ was applied to all statistical analyses. The SPSS statistical software package (version 17.0) for Windows (Chicago, IL) was used for all statistical analyses.

3. Results

3.1. Experiment 1: the effects of subchronic treatment with naltrexone or acamprosate on the response to ethanol

The goal of the first experiment was to establish dose–response curves for naltrexone (0, 1, 3 and 10 mg/kg, p.o.) and acamprosate (0, 35, 75 and 210 mg/kg, p.o.) on operant ethanol self-administration ($n = 10$ –12 per group). This was performed over five consecutive days (subchronic treatment). The ANOVA and post hoc data analyses indicated that only the highest dose of naltrexone (10 mg/kg) significantly suppressed the total number of ethanol responses [$F(3,39) = 10.25$, $p < 0.001$], as shown in Fig. 2a. Ethanol intake levels were between 0.61 ± 0.4 and 0.74 ± 0.5 g/kg (mean \pm SEM) in the vehicle group and between 0.32 ± 0.3 and 0.40 ± 0.3 g/kg in the group treated with 10 mg/kg naltrexone. Doses of 1 and 3 mg/kg of naltrexone failed to reduce the number of ethanol responses. Treatment with acamprosate at 35, 70 or 210 mg/kg produced no significant changes in the number of ethanol responses [$F(3,40) = 0.29$, $p = 0.831$], as shown in Fig. 2b. There were no significant differences in the activity towards the inactive lever. This experiment allowed us to select naltrexone for future experiments and eliminate acamprosate.

3.2. Experiment 2: the effects of the chronic administration of cocaine, naltrexone and their co-administration on the response to ethanol

The purpose of this experiment was two-fold: first, to establish a dose–response curve for cocaine (2.5, 10 and 20 mg/kg, i.p.) on the response to ethanol, and second, to investigate whether the effective dose of naltrexone (10 mg/kg, p.o.) could prevent operant ethanol self-administration even with the co-administration of cocaine, which is the most common pattern of human cocaine use (e.g., Gossop et al., 2006; Miller et al., 1989). This experiment was performed over 14 consecutive days (chronic treatment). Cocaine caused a dose-dependent increase in the number of responses to ethanol [$F(3,42) = 6.42$, $p < 0.001$], as shown in Fig. 3a ($n = 10$ –12 per group). A post hoc analysis revealed that (a) the highest dose of

cocaine (20 mg/kg) significantly increased the total number of ethanol responses and (b) the number of ethanol responses from the group treated with the lowest dose of cocaine (2.5 mg/kg) was lower than those of the groups receiving the other two doses of cocaine. There were no significant differences in the activity towards the inactive lever (between 1 and 7 responses). Fig. 3b shows the evolution of the number of ethanol responses averaged over two days during the 14 days of treatment with cocaine.

Chronic treatment with naltrexone (10 mg/kg, p.o.) significantly reduced the total number of responses to ethanol compared with the number of responses made by the vehicle group [$F(3,40) = 19.84$, $p < 0.001$], as shown in Fig. 4a ($n = 10$ –12 per group). This supports our results from the subchronic experiment. Further, the post hoc analysis revealed that both cocaine doses (10 and 20 mg/kg, i.p.) fully reversed the naltrexone-induced reduction in operant ethanol self-administration. Moreover, the number of ethanol responses made by the groups treated with both cocaine doses was increased compared with the number made by the vehicle group. Fig. 4b shows the responses averaged over two days for alcohol self-administration during the 14 days of treatment with naltrexone and cocaine.

3.3. Experiment 3: the effects of cocaine, naltrexone and their co-administration on locomotor activity

The aim of the third experiment was to evaluate locomotor activity after treatment with cocaine, with the effective dose of naltrexone (10 mg/kg, p.o.) and with a combination of the two drugs (Fig. 5). With this information, we intended to determine whether cocaine-induced motor sensitisation would be associated with operant ethanol responses and, more importantly, whether cocaine-induced motor sensitisation would be prevented by naltrexone. An ANOVA [cocaine $F(2,44) = 28.37$, $p < 0.001$; naltrexone $F(6,609) = 1.44$, $p = 0.006$] and a post hoc analysis showed that only the 10 and 20 mg/kg i.p. doses of cocaine increased the total locomotor activity (horizontal and vertical) compared with the responses of the vehicle-control group. Naltrexone had no effect on locomotor activity ($n = 10$ –12 per group). Also, naltrexone failed to prevent cocaine-induced locomotor activity: the locomotor activity of the groups of rats treated with naltrexone and 10 or 20 mg/kg of cocaine was significantly higher than that of the vehicle-control group. Finally, there were no

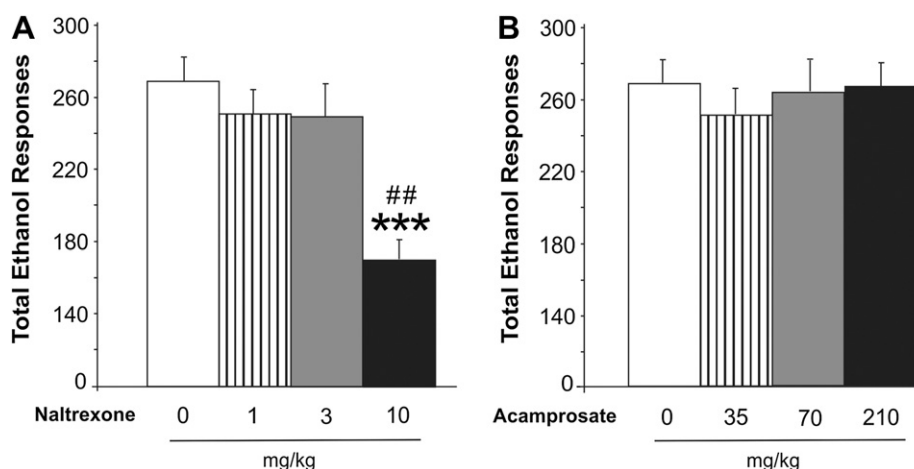


Fig. 2. Naltrexone significantly reduces operant ethanol self-administration in rats. The total number of lever presses during the 5 day period of treatment is shown. (A) Subchronic treatment with naltrexone (10 mg/kg, p.o., Antaxone®) decreased the self-administration of ethanol. (B) Subchronic treatment with Acamprosate (p.o., Campral®) did not cause any change. Values are expressed as the mean \pm SEM of $n = 10$ –12. *** $p < 0.001$ compared with the vehicle. ## $p < 0.01$ compared with 1 and 3 mg/kg of naltrexone. A one-way ANOVA was followed by Tukey's post-hoc test.

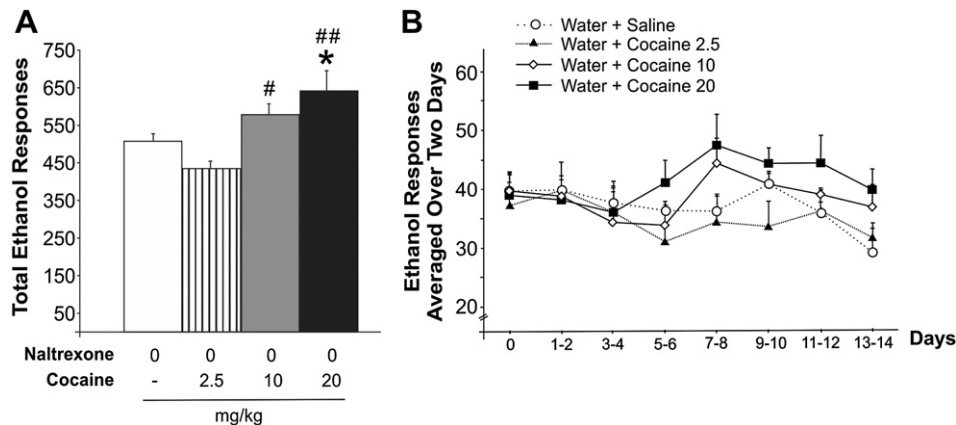


Fig. 3. Cocaine significantly increases the operant ethanol self-administration in rats. (A) The total number of lever presses during the 14 day treatment period is shown. Chronic treatment with cocaine (20 mg/kg, i.p.) increased the number of ethanol responses compared to the vehicle treatment. Values are expressed as the mean \pm SEM of $n = 10-12$. * $p < 0.05$. A two-way ANOVA was followed by Tukey's post-hoc test. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compared with 2.5 mg/kg of cocaine. (B) Two-day time course of ethanol responses.

significant differences between the groups treated with cocaine alone and the groups treated with a combination of naltrexone and cocaine.

3.4. Experiment 4: the effects of ethanol, cocaine and naltrexone on immediate-early gene expression in the rat prefrontal cortex

In the fourth and final experiment, we explored the genetic expression of the most common immediate-early genes used to map brain activity associated with behaviour (Kubik et al., 2007). There is ample evidence that the prefrontal cortex is involved in drug addiction (e.g., Lüscher and Malenka, 2011) and, more specifically, in ethanol operant self-administration (Dayas et al., 2007). Fig. 6 emphasises the results of a two-way ANOVA analysis of *C-fos* and *COX-2* gene expression [treatment $F(7,609) = 7.46$, $p < 0.001$; gene $F(6,609) = 54.81$, $p < 0.001$; interaction $F(42,609) = 5.64$, $p < 0.001$] and the subsequent Bonferroni post hoc analysis. Operant ethanol self-administration significantly reduced the expression of the *C-fos* gene in all groups ($p < 0.001$) except for the group treated with 2.5 mg/kg cocaine when compared with the saccharin group (calibrator group). Furthermore, ethanol treatment increased the expression of the *COX-2* ($p < 0.001$) and *Homer1a* ($p = 0.007$, data not shown) genes. All treatments blocked the

increased *COX-2* gene expression induced by ethanol ($p < 0.001$). *Zif-268*, *Bdnf*, *Arc* and *Rheb* gene expression was not altered by operant ethanol self-administration.

The right column of Table 1 shows the estimated amount of DNA of each gene in the prefrontal cortex of each rat in the saccharin-untreated group (the calibrator group). The quantity of DNA of each gene, assuming a 100% PCR efficiency, doubles every cycle; every 3.32 cycles represent a 10-fold increase in the amount of DNA. The genes are listed according to their estimated expression in the prefrontal cortex in the saccharin group.

4. Discussion

4.1. Naltrexone treatment for ethanol dependence

Opioid antagonists have been widely studied for the treatment of ethanol dependence (Hillemacher et al., 2011; Johnson, 2006, 2008; Soyka and Rösner, 2008; Walker and Koob, 2008; Walker et al., 2011). Of these antagonists, naltrexone seems to be one of the safest and most effective by multiple routes of administration (Johnson et al., 2004; Rösner et al., 2010). We selected the doses based on the results of previous studies (Blumberg and Ikeda, 1978; Czachowski and DeLory, 2009; Stromberg et al., 1998), and we

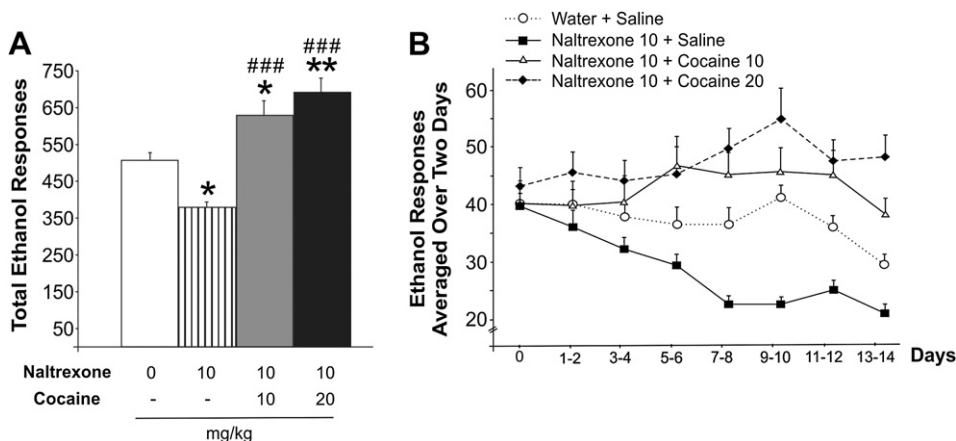


Fig. 4. Cocaine reverses the naltrexone-induced reduction in operant ethanol self-administration in rats. (A) The total number of lever presses during the 14 day treatment period is shown. Chronic treatment with cocaine (10 and 20 mg/kg, i.p.) fully reversed the reduction of ethanol responses caused by chronic treatment with naltrexone (10 mg/kg, p.o., Antaxone®). Values are expressed as the mean \pm SEM of $n = 10-12$. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the vehicle. ### $p < 0.001$ compared with 10 mg/kg naltrexone using a two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. (B) A two-day time course of ethanol responses.

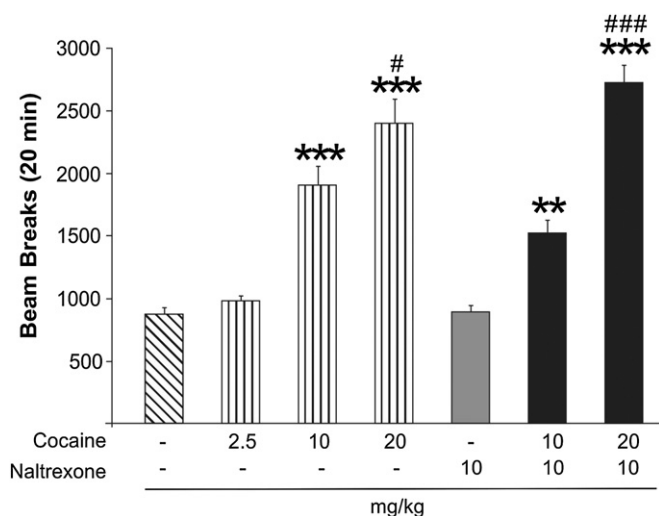


Fig. 5. Naltrexone fails to prevent the cocaine-induced increase in locomotor activity in rats. The number of beam breaks during a 20 min period is shown. Cocaine (i.p.) at 10 and 20 mg/kg caused a dose-dependent increase in total locomotor activity (horizontal and vertical). The 10 mg/kg naltrexone dose (p.o., Antaxone®) did not affect locomotor activity. Values are expressed as the mean \pm SEM of $n = 10$ –12. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the vehicle. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ compared with 10 mg/kg cocaine. A one-way ANOVA was followed by Tukey's post hoc test.

adapted them to the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of oral administration, that is, oral naltrexone achieves its peak plasma levels 60 min after administration (Verebey et al., 1976) and the presence of food decreases the pharmacological activity of acamprosate by decreasing its rate of absorption to less than 10% during the first 24 h (Spanish Agency for Medicines

and Health Products (AEMPS), Online Medicines Information Center; FDA Approved Drug Products (Drugs@FDA)).

Our data extend previous reports of animal models that show that naltrexone attenuates context-induced ethanol seeking (Marinelli et al., 2007), blocks the increased ethanol consumption following a period of abstinence known as the ethanol deprivation effect (Heyser et al., 2003), increases the extinction of responses to ethanol and attenuates the cue-induced reinstatement of ethanol-reinforced behaviour (Bienkowski et al., 1999). Furthermore, we believe that our results have a higher predictive validity for humans because we treated the animals orally with the liquid naltrexone available in pharmacies under the brand name of Antaxone®. Here, a dose of 10 mg/kg (p.o.) was found effective. However, our results exhibit distinct differences from previous studies using animal models. It has been reported that lower doses of naltrexone, 0.05–0.45 mg/kg (Ji et al., 2008) or 0.1–1 mg/kg (Walker and Koob, 2008), decreased the number of lever presses for ethanol and ethanol intake in the two-bottle free-choice paradigm. The most plausible explanation for these discrepancies is that those authors subcutaneously administered naltrexone, a route approximately 30-fold more potent than an intraperitoneal injection (Williams and Broadbridge, 2009); naltrexone is expected to be even less potent administered orally as it was in this study than by intraperitoneal injection.

In this study, animals were also orally treated with acamprosate (Campral®), but none of the doses tested reduced the number of operant ethanol responses. Acamprosate is prescribed to maintain abstinence in individuals who are already abstinent at the initiation of treatment (Mason, 2005), whereas naltrexone is effective in reducing ethanol intake and relapse but less effective in supporting the maintenance of abstinence (Garbutt, 2010). These facts suggest that the specific neurobiology of naltrexone (opioid neurotransmission) and acamprosate (the amino acid neurotransmitters GABA and glutamate) may be linked to different stages of alcoholism; thus, it may be useful to integrate these treatments. Accordingly, some research using animal models shows that a combination of naltrexone and acamprosate could be more effective than either compound alone to prevent the alcohol deprivation effect in rats (Heyser et al., 2003) or in mice in a limited access alcohol model (Kim et al., 2004). In humans, the combined administration of the compounds has been proven to be behaviourally and pharmacologically safe (Johnson et al., 2003; Kiefer and Wiedemann, 2004).

4.2. Cocaine increases operant ethanol self-administration and reverses the naltrexone-induced reduction

Cocaine at 20 mg/kg increased the number of responses to obtain ethanol. Interestingly, this effect results from long-lasting neuroadaptations because cocaine was administered 6 h after the daily operant ethanol self-administration session. Thus, the animals did not have access to ethanol until approximately 17 h after the cocaine injection (see Fig. 1b). We followed this extended schedule because we wanted to avoid (a) cocaine-induced place-conditioned motor sensitisation and motor hyperactivity in the ethanol operant chambers (Antonou et al., 1998; Stromberg and Mackler, 2005), (b) a putative cocaine-induced aversion to ethanol (this effect has been repeatedly demonstrated with saccharin by several authors, e.g., Davis and Riley, 2007; Ferrari et al., 1991; Goudie et al., 1978), (c) the formation of coca-ethylene, a psychoactive compound that results from the co-administration of cocaine and ethanol (Hedaya and Pan, 1997; Laizure et al., 2003; Landry, 1992; Schechter, 1995), and (d) other non-controllable variables resulting from the concomitant exposure to cocaine and ethanol. For example, cocaine (1–30 mg/kg) administered 15 min prior to the test session suppresses lever-pressing for food (Ross and Schaal, 2002), and a similar reduction

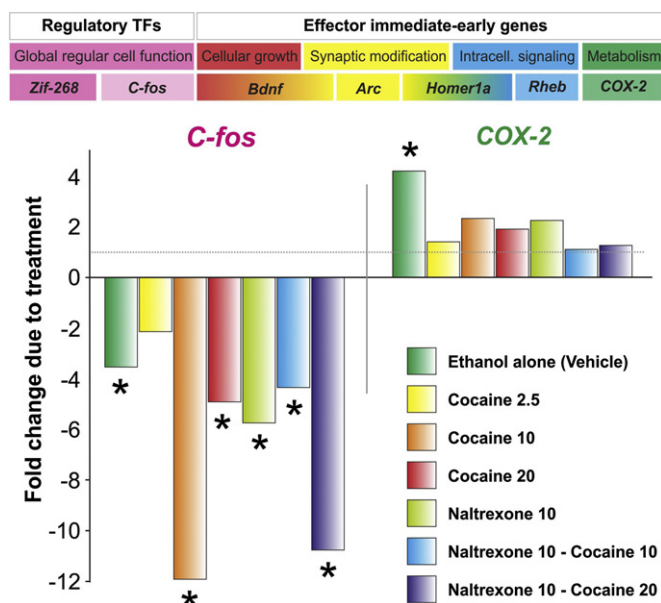


Fig. 6. Operant ethanol self-administration alters the immediate-early *C-fos* and *COX-2* gene expression in the rat prefrontal cortex. Ethanol self-administration alone (green bar) or combined with cocaine reduced the genetic expression of the *C-fos* gene 4- to 12-fold compared with the expression resulting from the consumption of saccharin (calibrator group, grey dotted line). Ethanol self-administration alone increased *COX-2* gene expression compared with saccharin consumption, but this effect was reversed by all the treatments. *These results indicate the significant effects of ethanol consumption (alone or in combination with cocaine/naltrexone) compared to saccharin consumption. The values are expressed as the mean \pm SEM of $n = 9$ –12. A two-way ANOVA was followed by Tukey's post hoc test. The levels of significance and other genes are detailed in the Results section.

in lever press rates for an ethanol solution has been observed with 10 and 30 mg/kg cocaine (van Haaren and Anderson, 1994). Therefore, we assume that the changes that we would observe in ethanol response should reflect long-lasting cocaine-induced effects rather than acute cocaine-induced effects.

In contrast, it could be argued that cocaine could cause an increase of lever presses as a result of the stereotypical behaviour induced by cocaine (Aliane et al., 2009), but the lack of effect on the activity towards the inactive lever makes this explanation unlikely. Another explanation that we consider more plausible is that this effect could be mediated by cocaine withdrawal. It has been recently demonstrated that functional and morphological changes occur in the brain after repeated injections of cocaine even in the absence a prolonged withdrawal period (Dobi et al., 2011). If this is the case, our results may indicate that such neuroadaptations induced by cocaine withdrawal alter the sensitivity to the effects of ethanol, resulting in an increased number of ethanol responses. There also appears to be a complementary relationship between the two drugs wherein exposure to ethanol alters the response to cocaine (Bernier et al., 2011; Mierzejewski et al., 2003); even rats that prefer ethanol are more sensitive to the reinforcing effects of cocaine self-administered to the brain (Katner et al., 2011).

Subchronic and chronic treatment with naltrexone reduced operant ethanol self-administration. The reason naltrexone was totally ineffective in the presence of cocaine remains unclear. One reasonable explanation is that the neurobiological changes induced by cocaine overcome those induced by naltrexone. Naltrexone exhibits an affinity 10–25 times higher for the mu opioid receptors than for the kappa or delta receptors (Mannelli et al., 2011). The activation of mu opioid receptors indirectly causes excitatory effects in dopaminergic neurons by inhibiting the release of the inhibitory neurotransmitter GABA in critical brain areas regulating euphoria and reward (Corbett et al., 2006; Guy et al., 2011; Nestler, 2001). Consequently, naltrexone blocks the activation of mu opioid receptors by ethanol as well as the synthesis and release of endogenous opioids induced by ethanol (Herz, 1997). In contrast, cocaine directly increases the extracellular levels of dopamine in brain-rewarding areas by two main mechanisms: inhibiting the dopaminergic transporter and enhancing its exocytotic release (Venton et al., 2006). This abundant release of dopamine is followed by the increased production of genetic transcription factors, which causes synaptic modifications such as dendrite sprouting and other intracellular changes to explain short- and long-term behavioural effects (Nestler, 2005). Therefore, it seems that the cocaine-induced neuroadaptations were unaffected by naltrexone treatment.

4.3. Naltrexone fails to block cocaine-induced locomotor activity

We can conclude that we replicated previous findings showing that cocaine increases locomotor activity (Ago et al., 2008). This occurred even in the absence of a context-dependent sensitisation (Mattson et al., 2008; Weiss et al., 1989) as far as the animals were tested only once on the locomotor apparatus. Despite the fact that naltrexone can attenuate amphetamine-induced conditioned locomotor sensitisation (Häggkvist et al., 2011), it did not alter cocaine-induced locomotor activity. This fact agrees with other reports (e.g., Smith et al., 2009), and our interpretation is that cocaine-induced neuroadaptations are minimally affected by naltrexone treatment.

4.4. Operant ethanol self-administration regulates the expression of immediate-early *C-fos* and *COX-2* genes in the rat prefrontal cortex

The expression of the *C-fos* gene in the prefrontal cortex was significantly reduced in all the groups of animals following ethanol

operant self-administration except for the group treated with the lowest dose of cocaine. Because *C-fos* is considered a marker of brain activation that demarcates neuronal populations undergoing long-term changes in function (Bialy and Kaczmarek, 1996; Morgan and Curran, 1991), our results suggest that there is an abnormal functioning of the prefrontal cortex during the time the animal is placed in the ethanol operant chamber. This has important implications. The prefrontal cortex sends neural projections to the nucleus accumbens and the ventral tegmental area, providing feedback and controlling these areas of the brain (Feil et al., 2010; López-Moreno et al., 2008). A loss of this feedback would impair the ability to overcome drives to obtain pleasure through unsafe actions (Kosten and George, 2002) and would make weighing options and self-control difficult (Nestler, 2005). Intriguingly, the conditioned stimulus-induced reinstatement of extinguished ethanol seeking in rats has been associated with increased *C-fos* expression within the prefrontal cortex that is not attenuated by naltrexone treatment (Dayas et al., 2007). These results strongly suggest that changes in *C-fos* expression within the prefrontal cortex are a useful biomarker of the behavioural phenotype of ethanol addiction.

One of our more interesting findings was that the expression of the *COX-2* gene was altered. Operant ethanol self-administration increased its expression up to four-fold. Because the animals were sacrificed at the point at which they would have been re-introduced into the operant chambers on day 15, it could be hypothesised that *COX-2* over-expression is associated with ethanol craving. The following evidence in the literature would not support this hypothesis: (a) the *COX-2* gene contributes to synapse-specific plasticity; it is a major mediator of inflammation, and it is over-expressed in many types of cancer (Aparicio-Gallego et al., 2007; Harper and Tyson-Capper, 2008; Kubik et al., 2007; Lanahan and Worley, 1998); and (b) previous reports have shown that chronic ethanol consumption increases *COX-2* mRNA levels in the hippocampus (Simonyi et al., 2002), the liver (Nanji et al., 1997) and the cerebral cortex of rats (Vallés et al., 2004), participating in the response to oxidative stress and ethanol-induced inflammation. Therefore, our results suggest that the over-expression of the *COX-2* gene may be associated with ethanol-induced neurotoxicity and is a consequence of ethanol exposure rather than a cause of ethanol intake. This is the first report to show that operant ethanol self-administration can modulate the activity of this gene. However, further studies are required to investigate why every treatment, cocaine, naltrexone and their combined administration, blocked the ethanol-induced over-expression of the *COX-2* gene. Currently, no study is exploring whether cocaine or naltrexone modulates the expression of this gene.

4.5. Final comments

The present work provides support for three ideas. First, our results, derived from an experimental set-up designed to maximise its predictive validity in humans, suggest that pharmacological treatment with naltrexone for alcoholism may be impaired when cocaine is co-administered. Second, our data reveal that daily chronic operant ethanol self-administration is associated with dramatic changes in gene expression in the rat prefrontal cortex. Third, naltrexone failed to block the ethanol-induced alterations of *C-fos* and *COX-2* gene expression. It would be of great interest to find a genetic biomarker of neural activation that could predict the behavioural efficacy of a pharmacological treatment for alcoholism.

Statement of interest

None.

Acknowledgements

This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria (Red de Trastornos Adictivos, RD06/0001/0011 to J.A.L.M. and RD06/0001/0001 to F.R. de F.), the Ministerio de Sanidad y Consumo (Plan Nacional Sobre Drogas, PR61/08-16415, to J.A.L.M.), the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-03763 and SAF2011-26818 to J.A.L.M., and SAF2004-06263-C02-02 to A.S.), and the Grupo de Investigación "Psicofarmacología de la Adicción" UCM-Banco Santander (Group 940157) to J.A.L.M. English editing was done by Elsevier Language Editing Services.

References

- Abernathy, K., Chandler, L.J., Woodward, J.J., 2010. Alcohol and the prefrontal cortex. *Int. Rev. Neurobiol.* 91, 289–320.
- AEMPS: Spanish Agency for Medicines and Health Products. <https://sinaem4.agemed.es/consaem/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm&version=new>.
- Ago, Y., Nakamura, S., Baba, A., Matsuda, T., 2008. Neuropsychotoxicity of abused drugs: effects of serotonin receptor ligands on methamphetamine- and cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 15–21.
- Aliane, V., Pérez, S., Nieoullon, A., Deniau, J.M., Kemel, M.L., 2009. Cocaine-induced stereotypy is linked to an imbalance between the medial prefrontal and sensorimotor circuits of the basal ganglia. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1269–1279.
- Antonou, K., Kafetzopoulos, E., Papadopoulos-Daifoti, Z., Hyphantis, T., Marselos, M., 1998. *D*-Amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 189–196.
- Aparicio-Gallego, G., Díaz Prado, S., Jiménez Fonseca, P., García Campelo, R., Cassinello Espinosa, J., Antón Aparicio, L.M., 2007. Cyclooxygenase-2 (COX-2): a molecular target in prostate cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 9, 694–702.
- Bernier, B.E., Whitaker, L.R., Morikawa, H., 2011. Previous ethanol experience enhances synaptic plasticity of NMDA receptors in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 31, 5205–5212.
- Biaty, M., Kaczmarek, L., 1996. c-Fos expression as a tool to search for the neurobiological base of the sexual behaviour of males. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 56, 567–577.
- Bienkowski, P., Kostowski, W., Koros, E., 1999. Ethanol-reinforced behaviour in the rat: effects of naltrexone. *Eur. J. Pharmacol.* 374, 321–327.
- Blumberg, H., Ikeda, C., 1978. Naltrexone, morphine and cocaine interactions in mice and rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206, 303–310.
- Burattini, C., McGeehan, A.J., Griffin 3rd, W.C., Gass, J.T., Kinder, J.R., Janak, P.H., et al., 2008. A microdialysis study of extracellular levels of acamprosate and naltrexone in the rat brain following acute and repeated administration. *Addict. Biol.* 13, 70–79.
- Camí, J., Farré, M., González, M.L., Segura, J., de la Torre, R., 1998. Cocaine metabolism in humans after use of alcohol. Clinical and research implications. *Recent Dev. Alcohol* 14, 437–455.
- Corbett, A.D., Henderson, G., McKnight, A.T., Paterson, S.J., 2006. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br. J. Pharmacol.* 147 (Suppl. 1), 153–162.
- Czachowski, C.L., DeLory, M.J., 2009. Acamprosate and naltrexone treatment effects on ethanol and sucrose seeking and intake in ethanol-dependent and nondependent rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 204, 335–348.
- Davis, C.M., Riley, A.L., 2007. The effects of cocaine preexposure on cocaine-induced taste aversion learning in Fischer and Lewis rat strains. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 87, 198–202.
- Dayas, C.V., Liu, X., Simms, J.A., Weiss, F., 2007. Distinct patterns of neural activation associated with ethanol seeking: effects of naltrexone. *Biol. Psychiatry* 61, 979–989.
- Dobi, A., Seabold, G.K., Christensen, C.H., Bock, R., Alvarez, V.A., 2011. Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal. *J. Neurosci.* 31, 1895–1904.
- Drugs@FDA: U.S. Food and Drug Administration, Approved Drug Products. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>.
- Feil, J., Sheppard, D., Fitzgerald, P.B., Yücel, M., Lubman, D.I., Bradshaw, J.L., 2010. Addiction, compulsive drug seeking, and the role of frontostriatal mechanisms in regulating inhibitory control. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 248–275.
- Ferrari, C.M., O'Connor, D.A., Riley, A.L., 1991. Cocaine-induced taste aversions: effects of route of administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38, 267–271.
- Fuller, R.K., Gordis, E., 2001. Naltrexone treatment for alcohol dependence. *N. Engl. J. Med.* 345, 1770–1771.
- Garbutt, J.C., 2010. Efficacy and tolerability of naltrexone in the management of alcohol dependence. *Curr. Pharm. Des.* 16, 2091–2097.
- Gossop, M., Manning, V., Ridge, G., 2006. Concurrent use of alcohol and cocaine: differences in patterns of use and problems among users of crack cocaine and cocaine powder. *Alcohol Alcohol* 41, 121–125.
- Goudie, A.J., Dickinson, D.W., Thornton, E.W., 1978. Cocaine-induced conditioned taste aversions in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 8, 757–761.
- Grant, B.F., Harford, T.C., 1990. Concurrent and simultaneous use of alcohol with cocaine: results of national survey. *Drug Alcohol Depend.* 25, 97–104.
- Guy, E.G., Choi, E., Pratt, W.E., 2011. Nucleus accumbens dopamine and mu-opioid receptors modulate the reinstatement of food-seeking behavior by food-associated cues. *Behav. Brain Res.* 219, 265–272.
- Häggkvist, J., Björkholm, C., Steensland, P., Lindholm, S., Franck, J., Schilström, B., 2011. Naltrexone attenuates amphetamine-induced locomotor sensitization in the rat. *Addict. Biol.* 16, 20–29.
- Harper, K.A., Tyson-Capper, A.J., 2008. Complexity of COX-2 gene regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 543–545.
- Hedaya, M.A., Pan, W.J., 1997. Effect of alcohol coadministration on the plasma and brain concentrations of cocaine in rats. *Drug Metab. Dispos.* 25, 647–650.
- Hersh, D., Van Kirk, J.R., Kranzler, H.R., 1998. Naltrexone treatment of comorbid alcohol and cocaine use disorders. *Psychopharmacology (Berl.)* 139, 44–52.
- Herz, A., 1997. Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl.)* 129, 99–111.
- Heyser, C.J., Moc, K., Koob, G.F., 2003. Effects of naltrexone alone and in combination with acamprosate on the alcohol deprivation effect in rats. *Neuropsychopharmacology* 28, 1463–1471.
- Hillemacher, T., Heberlein, A., Muschler, M.A., Bleich, S., Frieling, H., 2011. Opioid modulators for alcohol dependence. *Expert Opin. Investig. Drugs* 20, 1073–1086.
- Hubbell, C.L., Reid, L.D., 1990. Opioids modulate rats' intake of alcoholic beverages. In: Reid, L.D. (Ed.), *Opioids, Bulimia, and Alcohol Abuse and Alcoholism*. Springer-Verlag, New York, pp. 145–174.
- Ji, D., Gilpin, N.W., Richardson, H.N., Rivier, C.L., Koob, G.F., 2008. Effects of naltrexone, duloxetine, and a corticotropin-releasing factor type 1 receptor antagonist on binge-like alcohol drinking in rats. *Behav. Pharmacol.* 19, 1–12.
- Johnson, B.A., 2006. A synopsis of the pharmacological rationale, properties and therapeutic effects of depot preparations of naltrexone for treating alcohol dependence. *Expert Opin. Pharmacother.* 7, 1065–1073.
- Johnson, B.A., 2008. Update on neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings. *Biochem. Pharmacol.* 75, 34–56.
- Johnson, B.A., 2010. Medication treatment of different types of alcoholism. *Am. J. Psychiatry* 167, 630–639.
- Johnson, B.A., O'Malley, S.S., Ciraulo, D.A., Roache, J.D., Chambers, R.A., Sarid-Segal, O., et al., 2003. Dose-ranging kinetics and behavioral pharmacology of naltrexone and acamprosate, both alone and combined, in alcohol-dependent subjects. *J. Clin. Psychopharmacol.* 23, 281–293.
- Johnson, B.A., Ait-Daoud, N., Aubin, H.J., Van Den Brink, W., Guzzetta, R., Loewy, J., et al., 2004. A pilot evaluation of the safety and tolerability of repeat dose administration of long-acting injectable naltrexone (Vivitrex) in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 28, 1356–1361.
- Katner, S.N., Oster, S.M., Ding, Z.M., Deehan Jr., G.A., Toalston, J.E., Hauser, S.R., 2011. Alcohol-preferring (P) rats are more sensitive than Wistar rats to the reinforcing effects of cocaine self-administered directly into the nucleus accumbens shell. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99, 688–695.
- Kiefer, F., Mann, K., 2010. Acamprosate: how, where, and for whom does it work? Mechanism of action, treatment targets, and individualized therapy. *Curr. Pharm. Des.* 16, 2098–2102.
- Kiefer, F., Wiedemann, K., 2004. Combined therapy: what does acamprosate and naltrexone combination tell us? *Alcohol Alcohol* 39, 542–547.
- Kim, S.G., Han, B.D., Park, J.M., Kim, M.J., Stromberg, M.F., 2004. Effect of the combination of naltrexone and acamprosate on alcohol intake in mice. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 58, 30–36.
- Koob, G.F., Roberts, A.J., Kieffer, B.L., Heyser, C.J., Katner, S.N., Ciccocioppo, R., et al., 2003. Animal models of motivation for drinking in rodents with a focus on opioid receptor neuropharmacology. *Recent Dev. Alcohol* 16, 263–281.
- Kosten, T.R., George, T.P., 2002. The neurobiology of opioid dependence: implications for treatment. *Sci. Pract. Perspect.* 1, 13–20.
- Kranzler, H.R., Montejano, L.B., Stephenson, J.J., Wang, S., Gastfriend, D.R., 2010. Effects of naltrexone treatment for alcohol-related disorders on healthcare costs in an insured population. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 34, 1090–1097.
- Kubik, S., Miyashita, T., Guzowski, J.F., 2007. Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn. Memory* 14, 758–770.
- Kulaga, V., Shor, S., Koren, G., 2010. Correlation between drugs of abuse and alcohol by hair analysis: parents at risk for having children with fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol* 44, 615–621.
- Laizure, S.C., Mandrell, T., Gades, N.M., Parker, R.B., 2003. Cocaine metabolism and interaction with cocaine and ethanol: role of carboxylesterases. *Drug Metab. Dispos.* 31, 16–20.
- Lanahan, A., Worley, P., 1998. Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70, 37–43.
- Landry, M.J., 1992. An overview of cocaine, an alcohol-derived, psychoactive, cocaine metabolite. *J. Psychoact. Drugs* 24, 273–276.
- Li, J., Cheng, Y., Bian, W., Liu, X., Zhang, C., Ye, J.H., 2010. Region-specific induction of FosB/ΔFosB by voluntary alcohol intake: effects of naltrexone. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 34, 1742–1750.
- Littleton, J., 1995. Acamprosate in alcohol dependence: how does it work? *Addiction* 90, 1179–1188.
- López-Moreno, J.A., Trigo-Díaz, J.M., Rodríguez de Fonseca, F., González Cuevas, G., Gómez de Heras, R., Crespo Galán, I., et al., 2004. Nicotine in alcohol deprivation increases alcohol operant self-administration during reinstatement. *Neuropharmacology* 47, 1036–1044.

- López-Moreno, J.A., González-Cuevas, G., Moreno, G., Navarro, M., 2008. The pharmacology of the endocannabinoid system: functional and structural interactions with other neurotransmitter systems and their repercussions in behavioral addiction. *Addict. Biol.* 13, 160–187.
- Lucena, J., Blanco, M., Jurado, C., Rico, A., Salguero, M., Vazquez, R., et al., 2010. Cocaine-related sudden death: a prospective investigation in south-west Spain. *Eur. Heart J.* 31, 318–329.
- Lüscher, C., Malenka, R.C., 2011. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69, 650–663.
- Mannelli, P., Peindl, K.S., Wu, L.T., 2011. Pharmacological enhancement of naltrexone treatment for opioid dependence: a review. *Subst. Abuse Rehabil.* 2, 113–123.
- Marinelli, P.W., Funk, D., Juzysch, W., Li, Z., Lê, A.D., 2007. Effects of opioid receptor blockade on the renewal of alcohol seeking induced by context: relationship to c-fos mRNA expression. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2815–2823.
- Mason, B.J., 2003. Acamprosate and naltrexone treatment for alcohol dependence: an evidence-based risk-benefits assessment. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 13, 469–475.
- Mason, B.J., 2005. Acamprosate in the treatment of alcohol dependence. *Expert Opin. Pharmacother.* 6, 2103–2115.
- Mattson, B.J., Koya, E., Simmons, D.E., Mitchell, T.B., Berkow, A., Crombag, H.S., et al., 2008. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *Eur. J. Neurosci.* 27, 202–212.
- Mierzejewski, P., Rogowski, A., Stefanski, R., Goldberg, S., Kostowski, W., Bienkowski, P., 2003. Ethanol-reinforced behaviour predicts acquisition but not extinction of cocaine self-administration in the rat. *Alcohol Alcohol* 38, 543–549.
- Miller, N.S., Millman, R.B., Keskinen, S., 1989. The diagnosis of alcohol, cocaine, and other drug dependence in an inpatient treatment population. *J. Subst. Abuse Treat.* 6, 37–40.
- Morgan, J.I., Curran, T., 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 421–451.
- Nanji, A.A., Miao, L., Thomas, P., Rahemtulla, A., Khwaja, S., Zhao, S., 1997. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat. *Gastroenterology* 112, 943–951.
- Nestler, E.J., 2001. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 119–128. Erratum in: *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 215.
- Nestler, E.J., 2005. The neurobiology of cocaine addiction. *Sci. Pract. Perspect.* 3, 4–10.
- O'Brien, C.P., Volpicelli, L.A., Volpicelli, J.R., 1996. Naltrexone in the treatment of alcoholism: a clinical review. *Alcohol* 13, 35–39.
- O'Connor, A.D., Rusyniak, D.E., Bruno, A., 2005. Cerebrovascular and cardiovascular complications of alcohol and sympathomimetic drug abuse. *Med. Clin. North Am.* 89, 1343–1358.
- Odeleye, O.E., Watson, R.R., Eskelson, C.D., Earnest, D., 1993. Enhancement of cocaine-induced hepatotoxicity by ethanol. *Drug Alcohol Depend.* 31, 253–263.
- Oslin, D.W., Pettinati, H.M., Volpicelli, J.R., Wolf, A.L., Kampman, K.M., O'Brien, C.P., 1999. The effects of naltrexone on alcohol and cocaine use in dually addicted patients. *J. Subst. Abuse Treat.* 16, 163–167.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, fourth ed. Academic Press, San Diego.
- Pettinati, H.M., Kampman, K.M., Lynch, K.G., Suh, J.J., Dackis, C.A., Oslin, D.W., et al., 2008a. Gender differences with high-dose naltrexone in patients with co-occurring cocaine and alcohol dependence. *J. Subst. Abuse Treat.* 34, 378–390.
- Pettinati, H.M., Kampman, K.M., Lynch, K.G., Xie, H., Dackis, C., Rabinowitz, A.R., et al., 2008b. A double blind, placebo-controlled trial that combines disulfiram and naltrexone for treating co-occurring cocaine and alcohol dependence. *Addict. Behav.* 33, 651–667.
- Randall, T., 1992. Cocaine, alcohol mix in body to form even longer lasting, more lethal drug. *JAMA* 267, 1043–1044.
- Rösner, S., Hackl-Herrwerth, A., Leucht, S., Vecchi, S., Srisurapanont, M., Soyka, M., 2010. Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst. Rev.* 8, CD001867.
- Ross, L., Schaal, D.W., 2002. Time of supplemental feeding alters the effects of cocaine on lever pressing of rats. *J. Exp. Anal. Behav.* 77, 199–208.
- Rubio, G., Manzanares, J., Jiménez, M., Rodríguez-Jiménez, R., Martínez, I., Iribarren, M.M., et al., 2008. Use of cocaine by heavy drinkers increases vulnerability to developing alcohol dependence: a 4-year follow-up study. *J. Clin. Psychiatry* 69, 563–570.
- Sable, H.J., White, S.L., Steinpreis, R.E., 2004. Effects of chronic naltrexone treatment in rats on place preference and locomotor activation after acute administration of cocaethylene or ethanol plus cocaine. *Alcohol* 33, 51–61.
- Schechter, M.D., 1995. Cocaethylene produces conditioned place preference in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51, 549–552.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Schmitz, J.M., Stotts, A.L., Sayre, S.L., DeLaune, K.A., Grabowski, J., 2004. Treatment of cocaine-alcohol dependence with naltrexone and relapse prevention therapy. *Am. J. Addict.* 13, 333–341.
- Schmitz, J.M., Lindsay, J.A., Green, C.E., Herin, D.V., Stotts, A.L., Moeller, F.G., 2009. High-dose naltrexone therapy for cocaine-alcohol dependence. *Am. J. Addict.* 18, 356–362.
- Simonyi, A., Woods, D., Sun, A.Y., Sun, G.Y., 2002. Grape polyphenols inhibit chronic ethanol-induced COX-2 mRNA expression in rat brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26, 352–357.
- Smith, M.A., Greene-Naples, J.L., Felder, J.N., Iordanou, J.C., Lyle, M.A., Walker, K.L., 2009. The effects of repeated opioid administration on locomotor activity: II. Unidirectional cross-sensitization to cocaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 476–486.
- Soyka, M., Rösner, S., 2008. Opioid antagonists for pharmacological treatment of alcohol dependence – a critical review. *Curr. Drug Abuse Rev.* 1, 280–291.
- Spanagel, R., Ziegglänsberger, W., 1997. Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 54–59.
- Stromberg, M.F., Mackler, S.A., 2005. The effect of cocaine on the expression of motor activity and conditioned place preference in high and low alcohol-prefering Wistar rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 314–319.
- Stromberg, M.F., Casale, M., Volpicelli, L., Volpicelli, J.R., O'Brien, C.P., 1998. A comparison of the effects of the opioid antagonists naltrexone, naltrindole, and beta-funaltrexamine on ethanol consumption in the rat. *Alcohol* 15, 281–289.
- Stromberg, M.F., Mackler, S.A., Volpicelli, J.R., O'Brien, C.P., 2001. Effect of acamprosate and naltrexone, alone or in combination, on ethanol consumption. *Alcohol* 23, 109–116.
- Stromberg, M.F., Sengpiel, T., Mackler, S.A., Volpicelli, J.R., O'Brien, C.P., Vogel, W.H., 2002. Effect of naltrexone on oral consumption of concurrently available ethanol and cocaine in the rat. *Alcohol* 28, 169–179.
- Suh, J.J., Pettinati, H.M., Kampman, K.M., O'Brien, C.P., 2008. Gender differences in predictors of treatment attrition with high dose naltrexone in cocaine and alcohol dependence. *Am. J. Addict.* 17, 463–468.
- Vallés, S.L., Blanco, A.M., Pascual, M., Guerri, C., 2004. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol.* 14, 365–371.
- van Haaren, F., Anderson, K., 1994. Effects of cocaine on fixed-interval behavior and schedule-induced alcohol consumption in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47, 997–1002.
- Vanek, V.W., Dickey-White, H.I., Signs, S.A., Schechter, M.D., Buss, T., Kulics, A.T., 1996. Concurrent use of cocaine and alcohol by patients treated in the emergency department. *Ann. Emerg. Med.* 28, 508–514.
- Vengeliene, V., Celerier, E., Chaskiel, L., Penzo, F., Spanagel, R., 2009. Compulsive alcohol drinking in rodents. *Addict. Biol.* 14, 384–396.
- Venton, B.J., Seipel, A.T., Phillips, P.E., Wetzel, W.C., Gitler, D., Greengard, P., et al., 2006. Cocaine increases dopamine release by mobilization of a synapsin-dependent reserve pool. *J. Neurosci.* 26, 3206–3209.
- Verebey, K., Volavka, J., Mulé, S.J., Resnick, R.B., 1976. Naltrexone: disposition, metabolism, and effects after acute and chronic dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 20, 315–328.
- Vroegop, M.P., Franssen, E.J., van der Voort, P.H., van den Berg, T.N., Langeweg, R.J., Kramers, C., 2009. The emergency care of cocaine intoxications. *Neth. J. Med.* 67, 122–126.
- Walker, B.M., Koob, G.F., 2008. Pharmacological evidence for a motivational role of kappa-opioid systems in ethanol dependence. *Neuropsychopharmacology* 33, 643–652.
- Walker, B.M., Zorrilla, E.P., Koob, G.F., 2011. Systemic κ -opioid receptor antagonism by nor-binaltorphimine reduces dependence-induced excessive alcohol self-administration in rats. *Addict. Biol.* 16, 116–119.
- Weiss, S.R., Post, R.M., Pert, A., Woodward, R., Murman, D., 1989. Context-dependent cocaine sensitization: differential effect of haloperidol on development versus expression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 34, 655–661.
- Williams, K.L., Broadbridge, C.L., 2009. Potency of naltrexone to reduce ethanol self-administration in rats is greater for subcutaneous versus intraperitoneal injection. *Alcohol* 43, 119–126.
- World Health Organization, 2011. Global Information System on Alcohol and Health (GISAH). <http://apps.who.int/ghodata/?theme=GISAH>.
- Yu, J., Halder, D., Baek, M.N., Das, N.D., Choi, M.R., Oh, D.Y., 2011. Changes in the expression of transthyretin and protein kinase C γ genes in the prefrontal cortex in response to naltrexone. *Neurosci. Lett.* 488, 288–293.

ARTÍCULO 2

Echeverry-Alzate *et al.*, 2014. Effects of topiramate on ethanol-cocaine interactions and DNA methyltransferase gene expression in the rat prefrontal cortex. *Br J Pharmacol.* **171(12):3023-36.**

Impact Factor (2014): 4.842

RESEARCH PAPER

Effects of topiramate on ethanol-cocaine interactions and DNA methyltransferase gene expression in the rat prefrontal cortex

V Echeverry-Alzate¹, E Giné², K M Bühler¹, J Calleja-Conde¹, P Olmos^{1,3}, M A Gorriti¹, R Nadal⁴, F Rodríguez de Fonseca⁵ and J A López-Moreno¹

¹Department of Psychobiology, School of Psychology, Campus de Somosaguas, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, ²Department of Cellular Biology, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, ³C.I.E.M.A.T, Madrid, Spain, ⁴Psychobiology Unit, School of Psychology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, and ⁵Fundación IMABIS, Laboratorio de Medicina Regenerativa, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain

Correspondence

Jose Antonio López-Moreno,
Laboratorio de Psicobiología,
Departamento de Psicobiología,
Facultad de Psicología, Campus
Somosaguas, Universidad
Complutense de Madrid, Madrid
E-28223, Spain. E-mail:
jalopezm@psi.ucm.es

Keywords

operant ethanol
self-administration; Dnmt1
corepressors; histone
deacetylase-2; dual dependence;
DNA methyltransferases;
addiction; gene expression

Received

18 August 2013

Revised

27 January 2014

Accepted

1 February 2014

BACKGROUND AND PURPOSE

Recent and ongoing clinical studies have indicated that topiramate (Topamax®) could be effective in treating ethanol or cocaine abuse. However, the effects of topiramate on the co-administration of ethanol and cocaine remain largely unknown.

EXPERIMENTAL APPROACH

We studied the effects of topiramate, in Wistar rats, on operant ethanol self-administration with the co-administration of cocaine (i.p.). The psychomotor effects of topiramate were examined before ethanol self-administration and cocaine exposure. Blood samples were collected to analyse ethanol and cocaine metabolism (blood ethanol levels and benzoylecgonine). Quantitative real-time PCR was used to characterize the gene expression in the prefrontal cortex.

KEY RESULTS

Topiramate prevented the cocaine-induced increased response to ethanol in a dose-dependent manner without causing any motor impairment by itself. This effect was observed when topiramate was administered before ethanol access, but not when topiramate was administered before the cocaine injection. Topiramate did not block cocaine-induced psychomotor stimulation. Topiramate reduced blood ethanol levels but did not affect cocaine metabolism. Ethanol increased the gene expression of DNA methyltransferases (*Dnmt1* and *Dnmt3a*), the corepressor Dnmt1-associated protein 1 (*Dmap1*), and the RNA methyltransferase *Trdmt1*. These effects were prevented by topiramate or cocaine. Gene expression of histone deacetylase-2 and glutamate receptor kainate-1 were only increased by cocaine treatment. Topiramate and cocaine co-administration caused an up-regulation of dopamine (*Drd1*, *Th*) and opioid (*Oprm1*) receptor genes. Topiramate showed a tendency to alter episodic-like memory.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Topiramate is an effective inhibitor of the cocaine-induced increase in operant ethanol self-administration.

Abbreviations

Ca2, Ca4, carbonic anhydrase enzymes types II and IV; DMAP1, DNA methyltransferase 1-associated protein; DNMT1, DNA methyltransferase; *Grik1*, kainate receptor gene containing the GluK1 subunit; HDAC2, histone deacetylase-2; TRDMT1, tRNA aspartic acid methyltransferase 1

Introduction

Topiramate (Topamax, Janssen-Cilag S.A., Madrid, Spain) is a sulphamate that was discovered by Maryanoff and Gardocki through a model-based screening procedure, and was patented by McNeil Laboratories, Inc. in 1983 (Maryanoff and Gardocki, 1985; Tatum *et al.*, 2009). Work in animal models (mice and cats) revealed that topiramate has potent anticonvulsant activity, and this drug was approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of epilepsy in 1996 (Maryanoff *et al.*, 1987; Nakamura *et al.*, 1993; FDA, 1996). Topamax has also been approved for the prevention of migraine headaches in adults (FDA, 2012). Although the mechanism of action of topiramate is not fully understood, many results have indicated that this drug inhibits carbonic anhydrase enzymes types II and IV, which interact with diverse ion channels by either enhancing ion channel activity, as in GABA_A receptors (for receptor nomenclature see Alexander *et al.*, 2013b), or reducing ion channel activity, as in voltage-activated Na⁺ channels, Ca²⁺ channels and AMPA/kainate (but not at NMDA) receptors (see Johnson, 2005, for a review). Recently, it has been demonstrated that topiramate binds selectively to kainate receptors containing the GluK1 subunit (Braga *et al.*, 2009).

Currently, there are ongoing clinical trials to determine whether topiramate is effective in the treatment of ethanol abuse, cocaine abuse, or the dual dependence of ethanol and cocaine (ClinicalTrials.gov, US NIH, 2009). Topiramate has been shown to reduce ethanol consumption in Wistar rats using two-bottle choice tests (Knapp *et al.*, 2007); it reduced the motivation to lick for beer (Hargreaves and McGregor, 2007) and attenuated the withdrawal signs after chronic intermittent ethanol treatment (Cagetti *et al.*, 2004). Effects of topiramate on ethanol intake have also been demonstrated in rats that were selectively bred for high ethanol preference and in mice (Nguyen *et al.*, 2007; Breslin *et al.*, 2010; Zalewska-Kasubaska *et al.*, 2013). However, little is known about the effects of topiramate on operant ethanol self-administration in rats. Most of the evidence about the effects of topiramate on cocaine abuse comes from clinical studies in which topiramate reduced the reinforcing effects and cravings induced by cocaine in non-treatment-seeking research volunteers (Johnson *et al.*, 2013); reduced the craving intensity and duration during outpatient treatment for cocaine dependence (Reis *et al.*, 2008); and increased the probability of cocaine abstinence compared with placebo-treated subjects (Kampman *et al.*, 2004). These results contrast with previous preclinical studies in which rats and mice treated with topiramate did not exhibit a decrease in the response to cocaine (Le Foll *et al.*, 2008). Also topiramate was found to be ineffective at preventing cocaine-induced clonic seizures (Gasior *et al.*, 1999).

Currently, many authors are considering epigenetic explanations for drug addiction (see Robison and Nestler, 2011, for a review). The hypothesis is that drugs of abuse, such as ethanol and cocaine, alter the two key epigenetic mechanisms that control gene expression: histone modifications (such as acetylation, methylation and phosphorylation) and DNA methylation patterns. Methyltransferases are enzymes that transfer methyl groups onto DNA or RNA, and in many cases, methyltransferases recruit corepressor complexes for

repressing gene transcription. For example, DNA methyltransferase DNMT1 binds to histone deacetylase-2 (HDAC2) and DNA methyltransferase 1-associated protein (DMAP1), which act as corepressors of gene transcription (Rountree *et al.*, 2000). In addition, the maintenance of genomic methylation patterns are related to the ability of DNMT1 to bind to PCNA and the ability of ubiquitin-like Pleckstrin homology domain and ring finger domains 1 (UHRF1) to target DNMT1 (Schermelleh *et al.*, 2007; Hervouet *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2013). Recent studies have shown that DNMT1 gene expression is associated with alcohol-related behaviours (Botia *et al.*, 2012; Warnault *et al.*, 2013), but the association of this gene with cocaine remains unknown.

The aims of this study were (i) to determine the effects of topiramate on operant ethanol self-administration with the co-administration of cocaine and (ii) to investigate whether these effects were paralleled with changes in the expression of DNA/RNA methyltransferases, of key *Dnmt1* corepressor complexes, and of topiramate proteins targets. Additionally, we assessed the expression of key genes involved in dopaminergic (*Drd1*, *Drd2* and *Th*) and opioid neurotransmission (*Oprm1*), which are related directly to the rewarding effects of ethanol and cocaine.

Methods

Subjects

Ninety-six male Wistar rats (Harlan, Barcelona, Spain), weighing 275–325 g at the start of the experiments, were housed in groups of four per cage in a temperature- and humidity-controlled environment (21 ± 2°C, 60% relative humidity) on a 12 h reverse light/dark cycle (lights off at 0700 h). The same animals were used throughout the experiments. Seventy-one rats had access to ethanol and 25 only had access to saccharin in the operant self-administration procedures. An additional group of 32 rats was used to evaluate the effects of topiramate on episodic-like memory. That is, a total of 128 rats were used in this study. Experimental sessions were performed during the dark phase. Food and water were available *ad libitum* except as specified later. All research was conducted in strict adherence to the European Directive 2010/63/EU (EU 2010/63/EU) on the protection of animals used for scientific purposes. The Ethics Committee of the Faculty of Psychology of the Complutense University of Madrid approved the study. All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath *et al.*, 2010). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Drugs and general procedures for pharmacological treatments

Each day, a 10% ethanol v v⁻¹ solution was prepared from 99% ethanol (Alcoholes Aroca, S.L., Madrid, Spain). Cocaine hydrochloride (Sigma-Aldrich, S.L., Madrid, Spain) was dissolved in physiological saline and injected i.p. at a volume of 1 mL·kg⁻¹. Cocaine-control animals were injected with saline. Cocaine doses are expressed as the salt. Topiramate (2,3:4,5-bis-O-(1-methylethylidene)-beta-D-fructopyranose sulphamate; prepared as Topamax dispersible capsules,

Janssen-Cilag, S.A., Madrid, Spain) was dissolved in 25% β -cyclodextrin (Sigma-Aldrich) and was administered p.o. at a volume of 3 mL·kg⁻¹. Topiramate-control animals received a solution of 25% β -cyclodextrin in equivalent proportions to the animals treated with topiramate.

Throughout all of the experiments, cocaine was injected i.p. 6 h after the operant ethanol self-administration sessions. We followed this schedule to avoid cocaine-induced place-conditioned motor sensitization and motor hyperactivity in the operant ethanol chambers (Antoniou *et al.*, 1998; Stromberg and Mackler, 2005). The dose of cocaine was chosen based on previous studies done under similar experimental conditions, where 20 mg·kg⁻¹ cocaine resulted in a robust increase in operant ethanol self-administration (Echeverry-Alzate *et al.*, 2012).

Topamax was administered (p.o.) at different times depending on the experiment, but was generally administered 120 min before ethanol/cocaine administration because the peak plasma concentration occurs approximately 2 h after an oral dose [FDA, 1995; AEMPS (Spanish Agency for Medicines and Health Products), 2012]. The rats were not deprived of food before Topamax treatment because the absorption of topiramate is independent of food intake (FDA, 1995; AEMPS, 2012). The doses of Topamax were chosen based on previous studies in rats that investigated the effects of topiramate on ethanol-related behaviours (Hargreaves and McGregor, 2007; Zalewska-Kazubska *et al.*, 2007; Breslin *et al.*, 2010; Lynch *et al.*, 2011). The administration route and the use of a marketed drug (Topamax) were chosen to strengthen the ecological validity of the study, because these most closely resemble the situation for human patients.

Ethanol self-administration and motor experiments

Apparatus and procedure. The operant ethanol sessions were conducted in eight modular chambers enclosed in sound-proof cubicles (Med Associates, Inc., St. Albans, VT, USA). The exhaust fans were inactivated because the fans increased the rate of ethanol evaporation. The chambers were equipped with two retractable levers located 7 cm above a grid floor on either side of a drinking reservoir positioned in the centre of the front panel of the chamber and 4 cm above the grid floor. The levers were counterbalanced to respond as the active lever (delivering 0.1 mL) or as the inactive lever. As far as some animals press the levers two/three times to obtain the rewarding solution, the contents of the stainless dipper were accessible to the animal until the next lever press, at least 2.5 s later, to avoid measuring dipper presentations (rewards) as lever presses. It did not use light or sound as stimuli.

Training was conducted using a modification of the methods described by Alén *et al.* (2009). Briefly, the rats were placed on a restricted water intake schedule for 11 h ranging from 2 to 4 days to facilitate the training in lever pressing. The length of the water restriction was dependent upon the rate of learning of the animal, 4 days being the highest number of days water intake was restricted. After this period, for the rest of the experiment, the animals had access to food and water *ad libitum*. During the first 4 days of training, animals received a 1% w v⁻¹ saccharin solution (Sigma-Aldrich) in the dipper. Thereafter, the following sequence was used on a fixed-ratio 1 schedule of reinforcement: 0.2% sac-

charin for three sessions, 0.2% saccharin and 0.2% ethanol for three sessions, 0.16% saccharin and 2% ethanol for three sessions, 0.12% saccharin and 4% ethanol for three sessions, 0.08% saccharin and 6% ethanol for three sessions, 0.04% saccharin and 8% ethanol for three sessions, 0.02% saccharin and 10% ethanol for three sessions, and 10% ethanol for the remaining sessions. Twenty animals that had access to saccharin only and did not receive any pharmacological treatment during the study were used as the control group for the genetic expression experiments (the calibrator group – i.e. the non-ethanol-treated group). The baseline corresponded to the average number of ethanol responses obtained on the final 3 days before the first experiment in which the number of responses varied by 15% or less. Animals that did not reach at least 20 ethanol responses during the baseline period were omitted for the experiments ($n = 11$). All the operant ethanol sessions lasted 30 min under a fixed-ratio 1 schedule 7 days a week for the entire study.

The locomotor activity of the rats was assessed using six custom-made 40 × 35 × 35 cm rectangular boxes, and the boxes were equipped with eight photocells arranged in two lines (4 and 8 cm above the floor) that detected the locomotor activity as beam breaks.

Ethanol and benzoylecgonine analysis

To determine blood ethanol concentrations, 250 μ L of blood was collected from the rat tail vein into a capillary tube (Microvette® CB 300 K2E, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany) that contained EDTA dipotassium salt. The whole blood was centrifuged for 15 min at 1500× g using a refrigerated centrifuge, and the plasma was stored at –20°C until use. The ethanol concentration was measured using the Enzy-Chrom ethanol assay kit following the protocol recommended by the manufacturer (Bioassay Systems, Hayward, CA, USA). All measurements were performed in duplicate. See experiment 3 later for further details.

Benzoylecgonine, a main metabolite of cocaine, was measured in blood using the Cocaine Metabolite Direct ELISA Benzoylecgonine Assay Kit, following the manufacturer's instructions (Bio-Quant, Heidelberg, Germany). Approximately 400–450 μ L of blood from the rat trunk at the moment of killing (by decapitation) was collected in VACUT-EST tubes (Vacutest Kima S.r.l., Arzergrande, Italy) that contain K3 EDTA. Following, plasma was obtained as described earlier and stored at –20°C until use. See experiment 3 later for further details.

Test of novel object recognition

Object recognition memory was assessed in the six custom-made 40 × 35 × 35 cm rectangular boxes described earlier located in a dimly lit room (20 luxes). All the sessions were monitored by a video camera above the apparatus. One set of test objects was made of dark red glass (18 × 8 × 4.5 cm) and the second set of objects was made of steel (22 × 6 × 6 cm). Sessions were carried out following the protocol described by Ennaceur *et al.* (2005). On day 1 (habituation session), each rat was exposed to one box individually for 10 min to habituate to the test environment. On day 2 (sample session), rats were placed in the box and given 3 min to explore two identical sample objects. Following, the rats were removed from the box and returned to their cages for 15 min

(retention interval). Then, rats were placed in the same box with one familiar and one novel object (counterbalanced across rats) and given 3 min to explore the objects (test session). An experimenter who was blind to the experimental treatments scored the time the rats spent exploring each object, the latency of first approach to explore them and the frequency of approach. It was considered a valid object approach any directed contact with the mouth, nose or paw not including accidental contacts such as backing into the object (Bevins and Besheer, 2006).

Real-time quantitative PCR experiments

Real-time quantitative PCR, which has been described as one of the most powerful tools to quantify gene expression (Schmittgen and Livak, 2008), was performed using a Light-Cycler 480-II machine (Roche, Barcelona, Spain) with SYBR Green Real-time qPCR master mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) and specific primers at 300 nm concentrations (see Table 1). The melting curves analysis showed only a single clear peak, and the sizes of the PCR products were confirmed by agarose gel electrophoresis. A 10-fold dilution series of the template was used to amplify each gene to validate the efficiency of each assay and to confirm that the amplification efficiencies of the target and reference genes were comparable (indicated by a near-zero slope value for both the target and reference genes). The 18S ribosomal RNA gene was used as an internal control for normalization. The saccharin-vehicle group (the non-ethanol-treated group) was used as a calibrator (non-treated group, $n = 20$ after discarding the five more high extreme saccharin responses), and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to analyse the expression data (Schmittgen and Livak, 2008).

The animals were killed by decapitation immediately before the ethanol self-administration session (after chronic topiramate treatment). The prefrontal cortex, including the frontal association cortex and the more rostral/anterior regions of the lateral-ventral-dorsal-medial areas of the orbital cortex, prelimbic cortex and secondary motor cortex (Paxinos and Watson, 1998) were immediately dissected on ice, and were quickly frozen on dry ice at -80°C . Total RNA was isolated using Tripure Isolation Reagent (Roche) and was stored at -80°C . One microgram of total RNA was reverse transcribed into cDNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche).

Experimental design

Experiment 1: the effects of increasing the dose of topiramate on the response to ethanol and co-administration of cocaine. Here, we aimed to establish a dose-response curve for topiramate ($2.5\text{--}40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) on operant ethanol self-administration and cocaine co-administration (i.p.) (Figure 1A). Because topiramate often causes uncomfortable CNS side effects, such as sedation, and according to the dosage and topiramate administration protocols in clinical studies (Kampman *et al.*, 2004; ClinicalTrials.gov, US NIH, 2009), the doses of topiramate were progressively increased every 3 days, and each dose was divided into two doses (morning and afternoon dosing). Before the pharmacological treatments, the animals were matched and distributed among groups according to the number of ethanol responses exhibited at baseline.

To discard any of the sedative effects of topiramate from the highest doses, which could confound the results of the operant ethanol self-administration, we monitored the locomotor activity of the animals for 30 min before the animals gained access to the operant ethanol chambers (Figure 1B). The locomotor activity was examined in 5-min periods in a single assay, and the animals were fully counterbalanced.

Experiment 2: the effect of topiramate on the behavioural effects of cocaine. We conducted experiment 2 after a washout period of 3 days from experiment 1. This experiment was conducted to investigate whether the preventative effects of topiramate on the cocaine-induced increase in responses to ethanol could be determined at the moment of topiramate administration before cocaine injection or before ethanol self-administration (Figure 2A). In the first case, before cocaine injection, it might be assumed that topiramate would block the acquisition of the effects of cocaine on the response to ethanol, whereas in the second case, before ethanol self-administration, it may be assumed that topiramate would block the expression of the effects of cocaine on the response to ethanol. Therefore, the animals were treated with a dose of $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (p.o.) topiramate, which was found, in experiment 1, to be the most effective dose at preventing the increase in ethanol responses induced by cocaine and without motor impairment. In experiment 1, each dose was divided into two (morning and afternoon dosing). In experiment 2, topiramate was given either 120 min before the cocaine injection or 120 min before the operant ethanol session for 3 consecutive days. We used four groups of rats ($n = 9\text{--}11$), that they were fully counterbalanced; one group received the topiramate treatment before cocaine injection for 3 days and the other received the topiramate before ethanol access for another 3 days. There was a washout period of 3 days between treatments. Thus, all animals were treated with topiramate before cocaine and before ethanol, but in a different order, except the vehicle group that was never treated with either topiramate or cocaine.

In addition, we examined the effects of topiramate on the cocaine-induced psychostimulant motor activity (Figure 2B); 120 min after the administration of topiramate, the animals were treated with cocaine and were introduced immediately into the locomotor activity apparatus for 30 min. The activity of the animal was monitored in 5-min periods. The locomotor activity was examined in a single assay, and the animals were fully counterbalanced.

Experiment 3: the effects of chronic treatment with topiramate on the response to ethanol, the metabolism of cocaine and blood ethanol levels. We conducted experiment 3 after a washout period of 3 days from experiment 2. To study the effects of chronic treatment with topiramate on responses to ethanol and according to the results from the previous experiments, we decided to treat the animals with topiramate ($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) 120 min before operant ethanol self-administration for 8 consecutive days (Figure 3A). Additionally, we expected that with this chronic treatment regimen, we would be able to highlight the differences among groups for the ethanol/cocaine blood analysis and the subsequent genetic expression experiments. Blood for the analysis of ethanol was collected from the tail of the rats immediately after the operant ethanol

Table 1

Details about the base sequences of the primers used

Gene	Name	GenBank accession no.	Direction	Primer sequence (5'-3')	Amplicon length (nt)
Internal control	18S	18S ribosomal RNA gene	Left	GGAGCCTGAGAAACGGCTA	64
			Right	TCGGAGTGGGTAAATTTGC	
Topiramate targets	Ca2	Carbonic anhydrase 2 (Ca2), mRNA	Left	CATTACTGTACAGCAGTGACAGA	91
			Right	CCAGTTGTCCACCATCAGTTC	
	Ca4	Carbonic anhydrase 4 (Ca4), mRNA	Left	GGGAAGTTAAGAACCAACCACT	107
			Right	CAGGTGTAACCTGTATGGCCTTG	
RNA methyltransferases	Grik1	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 1 (Grik1), mRNA	Left	TTTGAAGCCTCCCGAAGAG	112
			Right	CCAGAGCATTGCCAATAGACTGT	
	Trdm1	tRNA aspartic acid methyltransferase 1 (Trdm1), mRNA	Left	CCCTCTCGACATCGTTAAGC	77
			Right	TCCCTTCTATGAGTTCATACC	
DNA methyltransferases	Rnmt	RNA (guanine-7-)-methyltransferase (Rnmt), mRNA	Left	TGAAACAAATGCTCTTAAACG	60
			Right	TTCTCGTTTCGCGAGGTATG	
	Dnmt1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	Left	GTCTACCGACTGGGTGACAGT	70
			Right	GGCTGGCCATTTGATGT	
Dnmt1 corepressors	Dnmt3a	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha	Left	AACGGAAGCGGATGAGT	70
			Right	ACTGCAATCACCTTGGCTTT	
	Hdac2	Histone deacetylase 2 (Hdac2), mRNA	Left	GCTGTCTCTCGAGTACTGAAA	110
			Right	GTCATCACGCGATCTGTTGT	
Reward system	Dmap1	DNA methyltransferase 1-associated protein 1 (Dmap1), mRNA	Left	CCTTTCGCCAGGTTCAATAA	91
			Right	CCTAGTCCATGCATCATCGT	
	Pcna	Pcna, mRNA	Left	GAACTTTTTCAAAAAGCCACTC	103
			Right	GTGTCCCATGTCAGCAATTTT	
	Uhrf1	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 (Uhrf1), mRNA	Left	GCTGGAGCCCTACACACTTC	60
			Right	TTGCCCTTGCTCTCCTTG	
	Drd1	Dopamine receptor D ₁	Left	CGAACTGTATGGTGCCCTTC	62
			Right	GATGGAATCGATGCAGAATG	
	Drd2	Dopamine receptor D ₂	Left	TGAACAGGCGGAGAGATGG	70
			Right	CTGGTGTCTTGACAGCATCTC	
	Th	Tyrosine hydroxylase	Left	TCTCCCTGAGGGGTACAAAA	77
			Right	GTGAATTTTGGCTTCAATGTCT	
	Oprm1	μ -Opioid receptor1	Left	GTGGATCGAACTAACCCACG	69
			Right	GAGACCCAGTTAGGGCAATG	

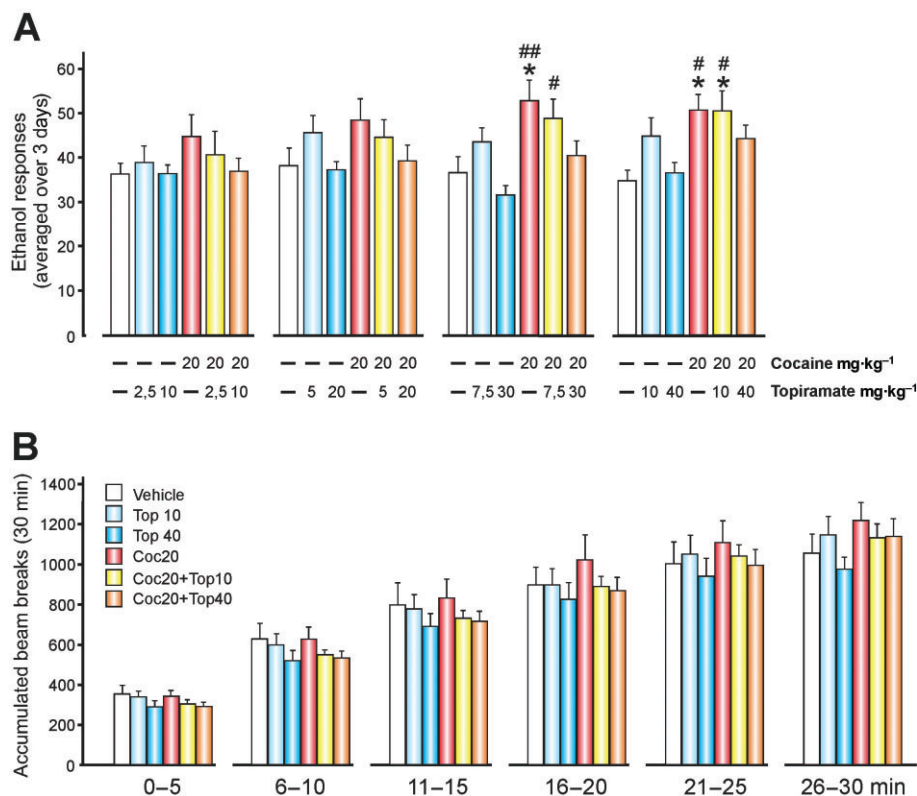


Figure 1

The effects of increasing the dose of topiramate on the response to ethanol and co-administration of cocaine. The doses of topiramate were progressively increased every 3 consecutive days, and each dose was divided into two doses (morning and afternoon dosing). During the morning, topiramate was administered 120 min before access to ethanol. During the afternoon, topiramate was administered 120 min after cocaine administration. (A) The mean \pm SEM of the operant responses for 10% v/v ethanol averaged over 3 days ($n = 9$ –11 per group). * $P < 0.05$ compared with the vehicle group; # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ compared with 30/40 mg·kg⁻¹ of topiramate. (B) Motor activity. Mean \pm SEM of the accumulated beam breaks observed for 30 min before the operant ethanol self-administration session. There were no significant differences between the groups.

self-administration session 2 days before they were killed. Blood for the analysis of the cocaine metabolite benzoylecgonine was collected from the rat trunk immediately before operant ethanol self-administration as they were killed.

Experiment 4: the effects of chronic topiramate treatment on the gene expression in the rat prefrontal cortex. The goal of this experiment was to investigate the changes in gene expression in the prefrontal cortex associated with our behavioural results (Figure 4A–E). For this purpose, we assessed the genetic expression of: (i) two DNA methyltransferases (*Dnmts*), *Dnmt1* and *Dnmt3a*, which methylate DNA; (ii) The RNA methyltransferases *Trdm1* (formerly known as *Dnmt2*) and *Rnmt* enzymes, which methylate tRNA and mRNA, respectively; (iii) the proteins that form *Dnmt1* corepressor complexes, *Hdac2*, *Dmap1*, *Pcna* and *Uhrf1*, which are described in the Introduction; (iv) key protein receptors targeted by topiramate, which include the kainate receptor containing the GluK1 subunit (*Grik1*) and the carbonic anhydrase enzymes types II and IV (*Ca2* and *Ca4*); and (v) proteins that regulate importantly the function of the reward system: the dopamine D₁ and D₂ receptors (for nomenclature see

Alexander *et al.*, 2013a), the tyrosine hydroxylase enzyme and the μ -opioid receptor.

We focused on the prefrontal cortex because of its contribution to addictive behaviour (Lüscher and Malenka, 2011), the involvement in regulating cognitive behaviour in rodents and in humans (Dayas *et al.*, 2007; Vengeliene *et al.*, 2009; Abernathy *et al.*, 2010), and the susceptibility to the effects of topiramate on genetic expression (Navarrete *et al.*, 2012).

Experiment 5: effects of topiramate on episodic-like memory. As topiramate has an effect on cognition in humans (e.g. Sommer *et al.*, 2013), we decided to investigate its effect on episodic memory. With this aim, we used the novel object recognition test, which has been proven useful for evaluating this type of declarative memory in animal models (Winters *et al.*, 2008). A group of 32 rats were divided as follows: (i) chronic group, which received every 3 days an increasing dose of topiramate p.o. (10, 20, 30 and 40 mg·kg⁻¹), divided into two doses (morning and afternoon dosing) as described in experiment 1; and (ii) acute and (iii) vehicle groups, which followed the same experimental manipulations as the chronic group but were treated with vehicle. Then, on the

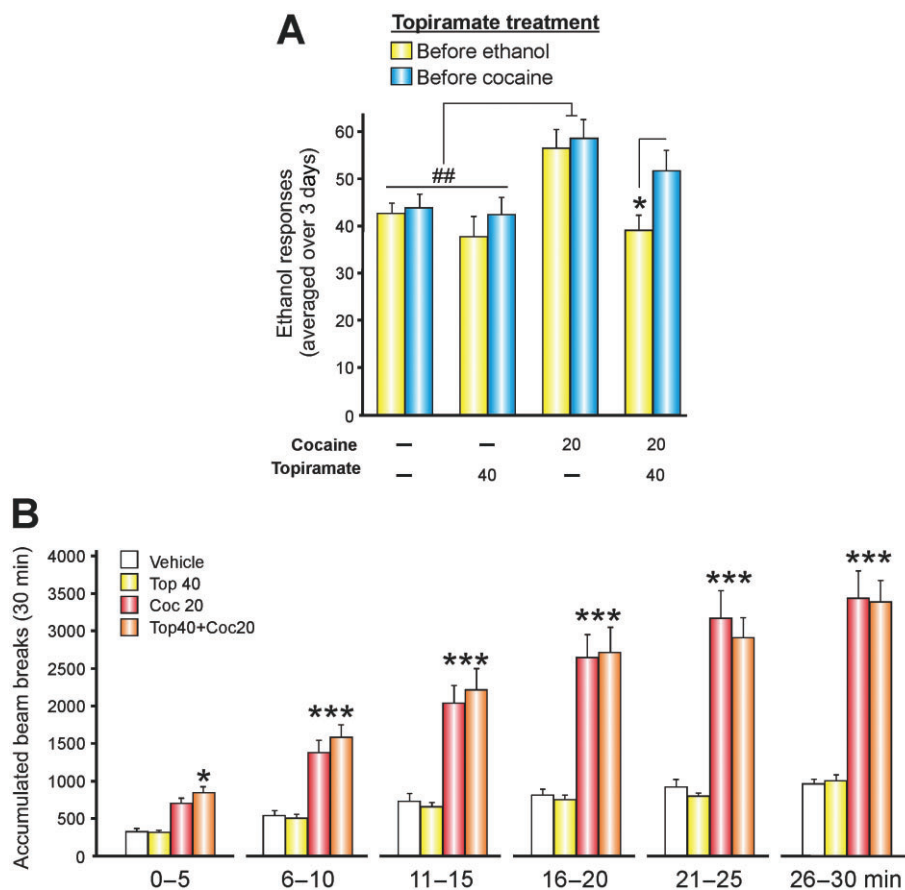


Figure 2

The effect of topiramate on the behavioural effects of cocaine. (A) A single dose of topiramate was administered either 120 min before the operant self-administration session or 120 min before the cocaine injection. Mean \pm SEM operant responses for 10% v/v ethanol was averaged over three days ($n = 9-11$ per group). ## $P < 0.01$ compared with the two cocaine-groups (20 mg·kg⁻¹). * $P < 0.05$ compared with the group treated with topiramate before cocaine injection. Only topiramate before ethanol was effective at reducing cocaine-induced responses to ethanol. (B) Motor activity. Mean \pm SEM of the accumulated beam breaks for the 30 min after cocaine injection. Topiramate was administered 120 min before the cocaine injection. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with the either the vehicle or the topiramate 40 mg·kg⁻¹ group.

13th day, whereas the chronic and acute groups were treated with topiramate 40 mg·kg⁻¹ 120 min before the novel object recognition test (sample session), the vehicle group was treated with vehicle.

Statistical analysis

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) statistical software package (version 20.0) for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used for all statistical analyses. The data from experiment 1 were analysed using a three-way ANOVA [increasing the doses ($\times 4$) or the time intervals ($\times 6$) as the within-subject factors and drug treatments ($\times 2$) as the between-subject factors]. The results from experiment 2 were analysed using a two-way ANOVA (with order and drug treatment as the between-subject factors). The motor data were analysed using a two-way ANOVA [with time intervals ($\times 6$) as the within-subject factor and the drug treatment as the between-subject factor]. The results from experiment 3, chronic topiramate treatment, were analysed using a one-way ANOVA (with drug treatment as the between-subject factor).

To test the relationship between blood ethanol levels and ethanol reinforcement, Pearson's correlation coefficient was used. The effects of topiramate on cocaine metabolites and blood ethanol levels were analysed using a one-way ANOVA. The data from experiment 4 were analysed using a one-way ANOVA (with the drug treatment as the between-subject factor). Here, Bonferroni's correction for multiple testing was applied, and only P -values ≤ 0.01 were considered statistically significant. The data from experiment 5 were analysed using a two-way ANOVA (with old/new object and drug treatment as the between-subject factors).

Results

Experiment 1: the effects of increasing the dose of topiramate on the response to ethanol and co-administration of cocaine

The ANOVA and *post hoc* data analyses indicated that topiramate did not reduce the response to ethanol, that cocaine

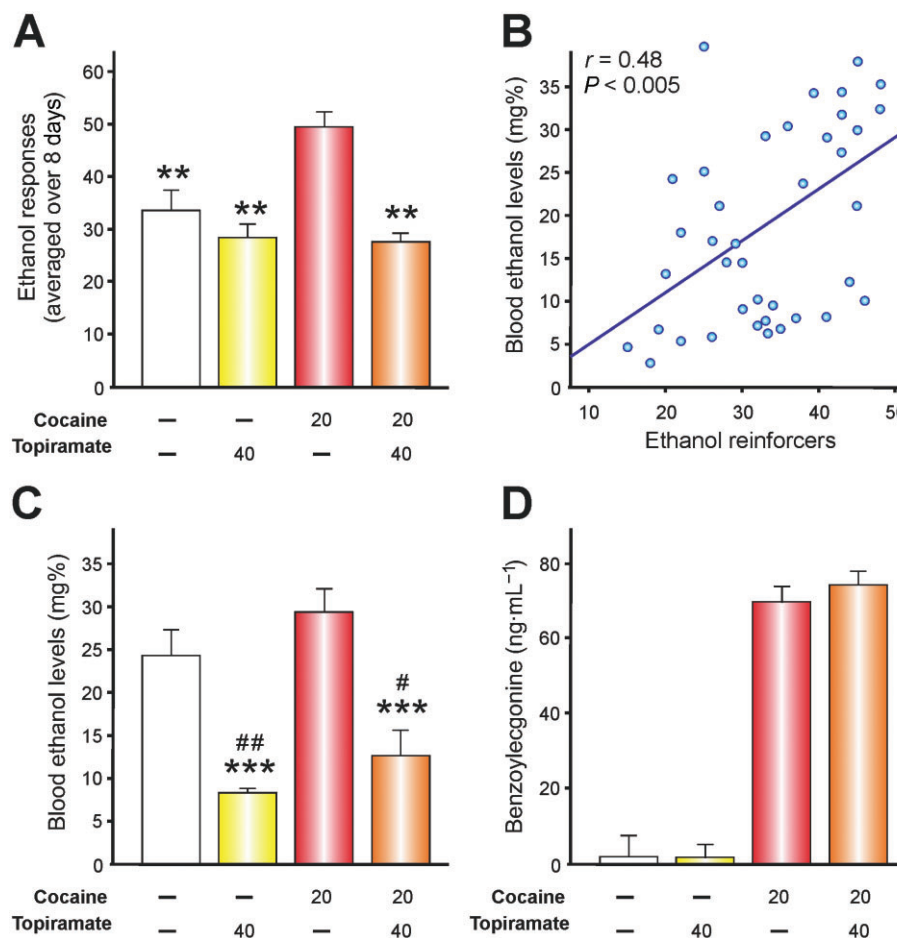


Figure 3

The effects of chronic topiramate treatment on the response to ethanol, cocaine metabolism and blood ethanol levels. (A) Mean \pm SEM operant responses for 10% v v⁻¹ ethanol averaged over 8 consecutive days ($n = 9$ –11 per group). ** $P < 0.01$ compared with the cocaine group (20 mg·kg⁻¹). (B) Scatter plot of reinforcements obtained by the rats during the 30 min ethanol session and blood ethanol levels (mg%) determined immediately after this test session. Reinforcements were significantly correlated with the blood ethanol levels. (C) Topiramate administered 120 min before the operant self-administration reduced the blood ethanol level (mg%) independently of cocaine treatment. *** $P < 0.001$ compared with the cocaine group (20 mg·kg⁻¹). # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ compared with the vehicle group. (D) Benzoyllecgonine (ng·mL⁻¹) was examined 18 h after the last cocaine administration and after alcohol self-administration. Topiramate did not change the metabolism of the cocaine.

(20 mg·kg⁻¹, i.p.) increased the responses to ethanol, and that topiramate blocked the cocaine-induced increase on the response to ethanol in a dose-dependent manner [topiramate $F(3,162) = 4.91$, $P < 0.005$; cocaine $F(1,54) = 6.57$, $P < 0.05$; interaction $F(3,162) = 3.34$, $P < 0.05$], as shown in Figure 1A. There were no significant differences in the activity towards the inactive lever. Additionally, the effects of cocaine on operant ethanol self-administration were shown after repeated injections (7–9th days).

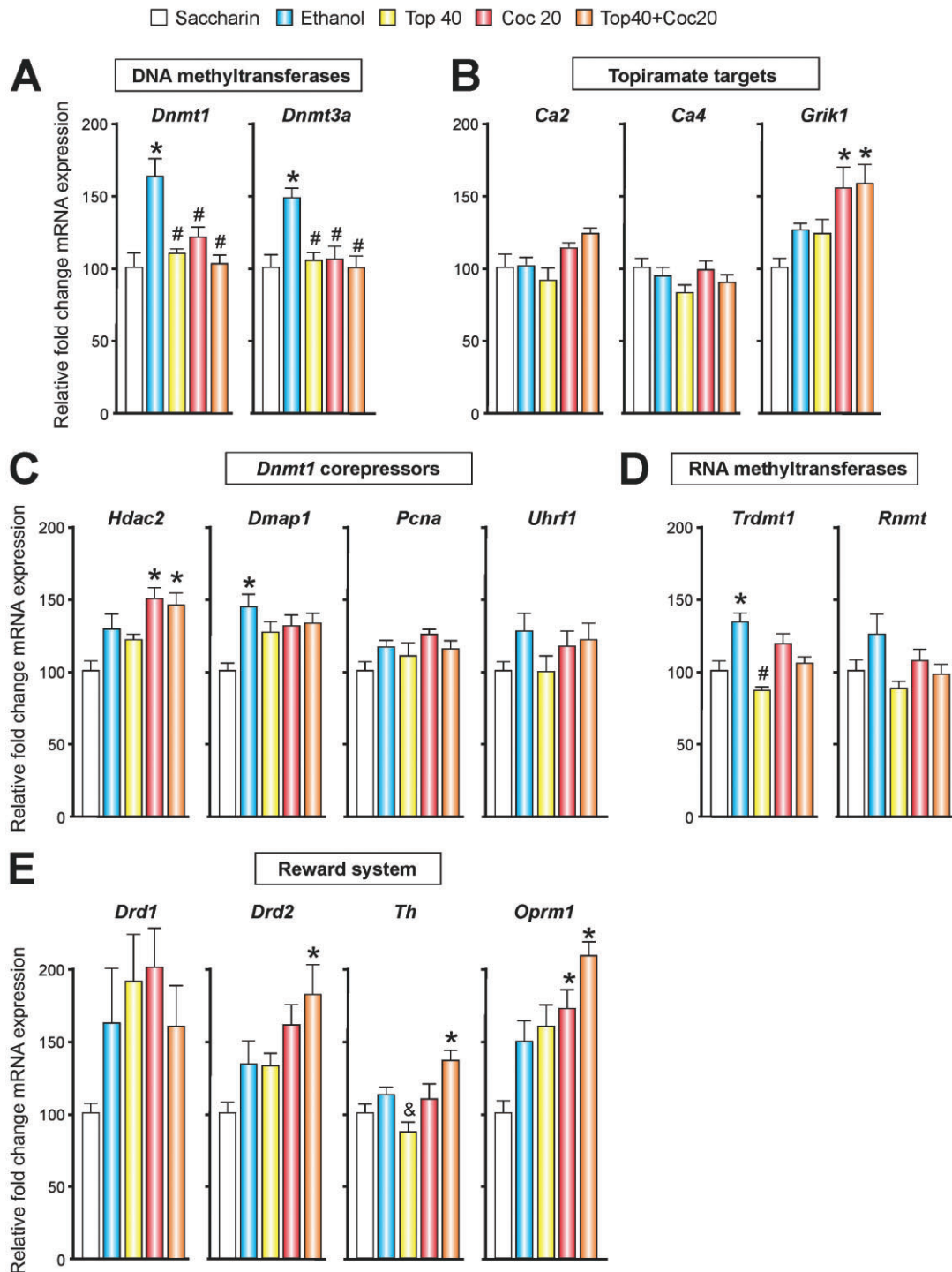
The locomotor activity of the animal was monitored during the 30 min prior to the introduction into the operant ethanol self-administration chamber. Figure 1B shows that there were no significant depressant/stimulant effects of topiramate among groups throughout this 30-min period [cocaine $F(2,54) = 0.32$, not significant (NS); topiramate $F(2,54) = 0.49$, NS]. These experiments allowed us to select the

dose of 40 mg·kg⁻¹ of topiramate for future experiments and discard the two groups of rats treated with the 10 mg·kg⁻¹ dose of topiramate.

Experiment 2: effects of topiramate on cocaine's behavioural effects

Figure 2A shows that topiramate administration prior to the cocaine injection failed to reduce the higher response rates to ethanol induced by cocaine. However, topiramate administration 120 min before ethanol access fully prevented the cocaine-induced higher response rates for ethanol [treatment $F(3,72) = 9.22$, $P < 0.001$; order $F(1,72) = 4.02$, $P < 0.05$; interaction $F(3,72) = 1.04$, NS].

We also evaluated the effects of topiramate on cocaine-induced psychostimulant motor activity. Figure 2B shows

**Figure 4**

The effects of chronic treatment with topiramate on gene expression in the rat prefrontal cortex. Mean \pm SEM the relative fold change using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (see Methods section). The 18S ribosomal RNA gene was used as an internal control for the normalization and gene expression of the operant saccharine self-administration group, which was used as the control (calibrator). (A) Ethanol increased the expression of the DNA methyltransferase genes, and topiramate or cocaine blocked this effect. (B) No changes were observed in the expression of carbonic anhydrase enzymes type II and IV (*Ca2* and *Ca4*), but cocaine increased the gene expression of the kainate receptor containing the GluK1 subunit (*Grik1*). (C) *Dnmt1* DNA methyltransferase corepressors showed heterogeneous results. Gene expression of *Hdac2* increased after cocaine treatment, and *Dmap1* increased after ethanol self-administration. (D) Ethanol increased the gene expression of the enzyme that methylates tRNA (*Trdmt1*, formerly known as *Dnmt2*). (E) The co-administration of topiramate and cocaine increased *Drd2*, *Th* and *Oprm1* gene expression and cocaine alone increased the *Oprm1* gene expression. * $P < 0.01$ compared with the saccharine-control group. # $P < 0.01$ compared with the ethanol group. & $P < 0.01$ compared with the topiramate + cocaine group.

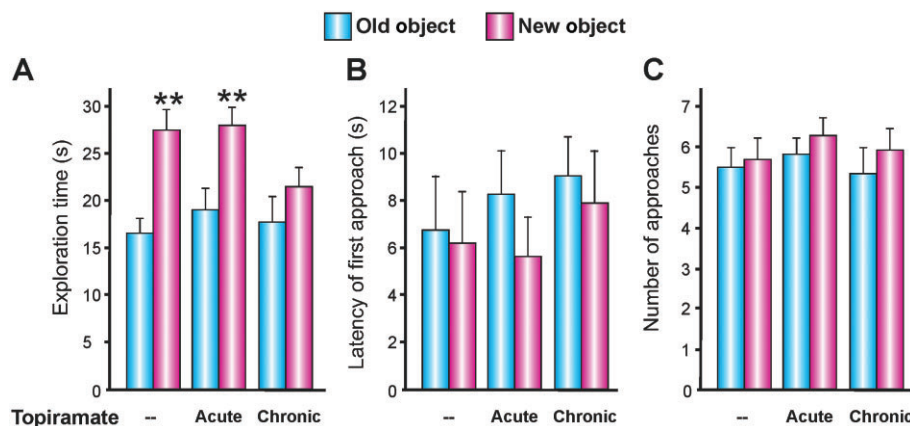


Figure 5

The effects of topiramate on episodic-like memory. (A) Mean \pm SEM total duration of approaches to an object over the three min of the test session. $**P < 0.01$ compared within-treatments. There were no significant differences between-treatments. (B) Mean \pm SEM latency of the first approach to an object and (C) mean \pm SEM frequency of approaches to an object over the three min of the test session. For the chronic group, the dose of topiramate (10, 20, 30 and 40 mg·kg⁻¹) was progressively increased every 3 consecutive days. The acute group was treated only once with topiramate, and the vehicle group was only treated with vehicle. Topiramate 40 mg·kg⁻¹ or vehicle was administered on the 13th day, 120 min before the sample session.

that cocaine caused a robust increase in the locomotor activity of the animal, and administering topiramate 120 min before the cocaine injection was not able to prevent this increase and did not show any effect on the spontaneous locomotor activity [treatment $F(3,37) = 16.94$, $P < 0.001$; time $F(5,185) = 161.83$, $P < 0.001$; interaction $F(15,185) = 16.32$, $P < 0.001$].

Experiment 3: the effects of chronic treatment with topiramate on the response to ethanol, cocaine metabolism and blood ethanol levels

As expected from the previous experiments, the chronic treatment with topiramate 120 min prior to the operant ethanol self-administration session fully prevented the increased response to ethanol induced by cocaine (Figure 3A). However, chronic topiramate treatment failed to significantly reduce the ethanol response by itself, without cocaine [drug treatment $F(3,39) = 13.39$, $P < 0.001$].

We found a positive correlation between the blood ethanol levels and the number of ethanol reinforcements received by the animals (Figure 3B) ($r = 0.48$, $P < 0.005$). The blood ethanol levels were significantly different as a function of the treatment group: topiramate either alone or in co-administration with cocaine reduced the ethanol concentration in the blood, and cocaine alone did not produce any significant change (Figure 3C) [drug treatment $F(3,39) = 15.04$, $P < 0.001$].

Benzoyllecgonine, one of the two primary metabolites of cocaine, was detected approximately 18 h after the last cocaine administration (Figure 3D) [drug treatment $F(3,36) = 59.75$, $P < 0.001$]. However, topiramate did not change the metabolism of cocaine, and the benzoyllecgonine levels were similar in the group only treated with cocaine and in the topiramate-cocaine group.

Experiment 4: the effects of chronic topiramate treatment on gene expression in the rat prefrontal cortex

Figures 4A and 5 show that operant ethanol self-administration caused an increase in the expression of DNA methyltransferases, and this effect was prevented by either topiramate or cocaine [$FDnmt1$ (4,56) = 12.95, $P < 0.001$; $FDnmt3a$ (4,61) = 4.60, $P < 0.005$] (Figure 4A). Cocaine, independently of topiramate treatment, increased the genetic expression of glutamate receptor kainate-1 ($Grik1$) [$F(4,56) = 2.73$, $P < 0.05$] (Figure 4B), which is targeted by topiramate, and $Hdac2$ [$F(4,54) = 6.27$, $P < 0.001$] (Figure 4C), which is a $Dnmt1$ corepressor. We also found that operant ethanol self-administration increased the mRNA levels of the $Dnmt1$ corepressor $Dmap1$ [$F(4,58) = 5.53$, $P < 0.005$] (Figure 4C) and the RNA methyltransferase $Trdmt1$ [$F(4,55) = 8.83$, $P < 0.001$] (Figure 4D), which methylates tRNA. The co-administration of topiramate and cocaine resulted in an increase of $Drd2$ [$F(4,64) = 5.40$, $P < 0.005$], Th [$F(4,54) = 6.61$, $P < 0.001$] and $Oprm1$ [$F(4,58) = 10.61$, $P < 0.001$] gene expression; and cocaine alone induced an increase of $Oprm1$ gene expression (Figure 4E).

Experiment 5: effects of topiramate on episodic-like memory

The two-way ANOVA revealed significant differences in total time exploring rats the new object through the test session (Figure 5A), but there were no significant differences caused by topiramate or its interaction with the new/old objects [objects $F(1,64) = 18.47$, $P < 0.001$; treatment $F(2,64) = 1.59$, $P = 0.21$, NS; interaction $F(2,61) = 1.32$, $P \leq 0.28$, NS]. Nevertheless, the individual analysis within-treatment showed that there were significant differences between the old and new objects in the acute and vehicle groups ($P = 0.01$), but not in the group treated chronically with topiramate. There were no

significant differences in the latency of first approach and frequency of approaches (Figure 5B and C).

Discussion

These experiments provide valuable information about the role of topiramate on ethanol–cocaine interactions. We report five major findings: (i) topiramate prevented the cocaine-induced increase in the response to ethanol in a dose-dependent manner without motor impairments; (ii) the preventative effects of topiramate on the high response rates to ethanol were explained by the suppression of the expression of the effects of cocaine rather than the blockade of the acquisition of the effects of cocaine; (iii) topiramate reduced blood ethanol levels independently of the co-administration of cocaine, but did not change the metabolism of cocaine; (iv) operant ethanol self-administration increased the gene expression of DNA methyltransferases and the RNA methyltransferase *Trdm1*, and this effect was fully blocked by either topiramate or cocaine; and (v) cocaine increased the genetic expression of *Grik1* and *Hdac2*, and topiramate did not inhibit this increase.

Although there are ongoing clinical trials and a recent study regarding the effects of topiramate on the dual dependence of ethanol and cocaine has been published (ClinicalTrials.gov, US NIH, 2009; Kampman *et al.*, 2013), this is the first preclinical study demonstrating the effects of topiramate treatment on the co-administration of ethanol and cocaine. However, topiramate alone was not able to reduce the response to ethanol. This result agrees with those from previous studies that showed either that topiramate did not alter the responses of mice to ethanol (Navarrete *et al.*, 2012), or that topiramate was ineffective in reducing ethanol consumption in Wistar rats (Breslin *et al.*, 2010; Lynch *et al.*, 2011). However, our results contrast with other reports showing that topiramate reduced ethanol consumption and reduced the motivation to lick for beer in animal models (Hargreaves and McGregor, 2007; Knapp *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2007), and reduced ethanol consumption, craving and increased the number of abstinent days from ethanol use in humans (Johnson *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 2004; Shinn and Greenfield, 2010). One plausible hypothesis for these discrepancies is that the effects of topiramate on ethanol-related behaviour are dependent upon the amounts of ethanol used by the subjects. This hypothesis predicts that the probability of topiramate having an effect on alcohol intake would be greater in subjects with higher levels of ethanol consumption than in subjects with lower levels. Indeed, the Johnson group demonstrated in at least two studies that the severity of drinking is a predictor of the efficacy of topiramate (Breslin *et al.*, 2010; Lynch *et al.*, 2011). These authors found that topiramate reduced ethanol consumption and relapse in ethanol-preferring rats, which are characterized by excessive ethanol drinking, whereas topiramate did not affect ethanol consumption in Wistar rats. In the present study, topiramate was effective at reducing the increased response to ethanol induced by cocaine. The same response has also been observed for cocaine response. Subjects with more severe cocaine withdrawal symptoms responded better to topiramate (Kampman *et al.*, 2013).

Our results also show that the preventative effects of topiramate were not explained by any motor impairment, and according to previous reports (Echeverry-Alzate *et al.*, 2012), the cocaine-induced increase in the response to ethanol is a result of chronic cocaine exposure rather than an acute consequence, as these effects appear after the sixth to seventh day of cocaine treatment. The question remained whether topiramate blocks the acquisition of the effects of the cocaine treatment or whether topiramate blocks the expression of the effects of the cocaine treatment on operant ethanol self-administration. Repeated exposure to cocaine causes behavioural sensitization, progressively increasing psychostimulant motor activity, and neuronal sensitization of glutamatergic projections from the prefrontal cortex to mesolimbic structures (Ghasemzadeh *et al.*, 2009; Liu and Steketee, 2011). In the present study, administering topiramate 120 min before cocaine did not change the cocaine-induced psychostimulant motor activity and did not prevent the increased response to ethanol. Both results suggest that topiramate is not altering the main effects of cocaine in the rat brain. However, administering topiramate 120 min before the operant ethanol self-administration session, acute or chronically, fully prevented the increased response to ethanol induced by cocaine. Therefore, it seems more reasonable to assume that topiramate is blocking the effects of cocaine on ethanol self-administration. It has been proposed that topiramate normalizes neuronal sensitization and reduces the symptoms of cocaine withdrawal (Johnson, 2005). For instance, because there is an increase in the number of glutamate receptors in the nucleus accumbens after a short period of cocaine withdrawal (Dobi *et al.*, 2011) and the glutamatergic projections from the prefrontal cortex modulate the nucleus accumbens (Parsegian and See, 2014), our results raise the possibility that topiramate might be adjusting the cortico-mesolimbic activity, and as a consequence, reducing the craving or incentive salience for ethanol. This explanation agrees with the mechanism of action suggested by Johnson (2004), which is that topiramate antagonizes the ability of drugs of abuse to increase cortico-mesolimbic dopamine activity by facilitating GABA suppression and reducing the excitatory effects of glutamatergic receptors in the nucleus accumbens. Although we cannot provide an unequivocal answer to whether topiramate reduces the craving for ethanol, blocks cocaine withdrawal or reduces the salience of ethanol within the drinking occasion, our results provide supporting evidence about the efficacy of topiramate in terms of the dual dependence of ethanol and cocaine.

We have shown that topiramate interfered with ethanol metabolism independently of the cocaine treatment, resulting in a reduction in blood ethanol levels. This is an interesting result, as the reduction in blood ethanol levels was not linked to a reduction in operant ethanol self-administration. This might suggest that the reducing effects of topiramate on the cocaine group is likely more associated to psychological/emotional aspects of drug addiction, such as craving and incentive salience for ethanol, rather than the necessity of animals to reach fixed blood ethanol levels. According to FDA (2012), the side effects of topiramate include metabolic acidosis, which is due to the inhibitory effect of topiramate on carbonic anhydrase enzymes types II and IV. Additionally, it has been suggested that carbonic anhydrase inhibitors target

the NADH oxidoreductase enzyme, which uses NADH as a substrate (Innocenti *et al.*, 2005). This is relevant because, in addition to acetaldehyde, ethanol consumption leads to an accumulation of NADH, which is detected by the ethanol assay kit that we used here to analyse blood samples. Therefore, our results suggest that the reduction in blood ethanol levels caused by topiramate could be related to the interference with the activity of the NADH oxidoreductase enzyme. Further studies are needed to identify the mechanism of this interaction with additional biochemistry techniques. In contrast to ethanol, benzoylecgonine, one of the two primary metabolites of cocaine (Schindler and Goldberg, 2012), did not show significant differences among the groups after 18 h of cocaine administration, indicating that topiramate does not directly affect cocaine metabolism.

We obtained heterogeneous results in the genetic expression studies. We found that the expression of the RNA/DNA methyltransferases *Tnmdt1*, *Dnmt1* and *Dnmt3a* was increased in a similar way after operant ethanol self-administration. However, *Dnmt1* acts essentially on hemimethylated DNA and is implicated in the maintenance of DNA methylation patterns during DNA replication, and *Dnmt3a* shows *de novo* methyltransferase activity (Okano *et al.*, 1999; Bestor, 2000). Therefore, a logical conclusion would be that ethanol alters the activity of the maintenance and *de novo* patterns of DNA methylation in the rat prefrontal cortex. A recent report has demonstrated that either pre- or post-natal ethanol exposure results in an increase of *Dnmt1* and *Dnmt3a* expression in the rat hippocampus (Perkins *et al.*, 2013). Despite the lack of a clear explanation, this is the first study that shows that topiramate and cocaine prevent the increase of DNA methyltransferase gene expression induced by ethanol. Our initial hypothesis was that the expression of *Dnmt1* complex corepressors (*Hdac2*, *Dmap1*, *Pcna* and *Uhrf1*) would respond in a similar manner as *Dnmt1* did after operant ethanol self-administration. However, only the expression of the *Dmap1* exhibited an increase similar to *Dnmt1*. This result suggests that the recruitment of gene silencing corepressors by DNMT1 might be specific for the stimuli that cause the change in activity, which are ethanol and cocaine in the present study. Interestingly, despite that, *Hdac2* is recruited by DNMT1 as a corepressor of gene transcription, HDAC2 has transcriptional silencing activity by itself. HDAC2 is responsible for the removal of acetyl groups from specific histones, which results in gene transcription silencing. In this study, cocaine administration resulted in an increase in the gene expression of *Hdac2*, and this result agrees with recent work (Host *et al.*, 2011). This result indicates that cocaine administration is associated with an increase of gene silencing in the prefrontal cortex because of the stimulation of the *Hdac2* gene. Another unexpected result is that there was not a significant decrease on the genetic expression of the genes coding for the main proteins targeted for topiramate after chronic treatment, which include the carbonic anhydrase enzymes types II (*Ca2*) and IV (*Ca4*) and *Grik1*. However, cocaine increased the genetic expression of *Grik1*. This last finding is not surprising, considering all of the evidence linking cocaine glutamatergic signalling and cocaine addiction (see Schmidt and Pierce, 2010, for a review). Three of the four genes assessed, *Drd2*, *Th* and *Oprm1*, related to the reward system were up-regulated in the group treated with

topiramate and cocaine. Previous studies have demonstrated in animal models that cocaine increased the expression of these three genes (Balda *et al.*, 2009; Kreek *et al.*, 2012; Lawhorn *et al.*, 2013). Nevertheless, our results demonstrate, for the first time, that there is a clear effect with the co-administration of topiramate, but the underlying mechanism of action is unknown.

We expected to reduce the side effects of topiramate increasing the dose of topiramate progressively and dividing them into two doses (morning and afternoon dosing) as it is recommended in the clinical setting (Kampman *et al.*, 2004; ClinicalTrials.gov, US NIH, 2009). However, and surprisingly, those animals did not show significant differences exploring the new object (suggesting impaired episodic-like memory), whereas the animals treated acutely with topiramate 40 mg·kg⁻¹ and those treated merely with vehicle, showed a significant increase over the time spent with the new object (suggesting intact episodic-like memory). Therefore, our results may indicate that either low doses of topiramate should be considered in further studies or that it should be carefully evaluated in the risk-benefit ratio of using moderate/high doses of topiramate for the treatment of co-abuse of ethanol and cocaine.

In conclusion, we provided evidence for the efficacy of topiramate in the context of the dual dependence of ethanol and cocaine. Furthermore, we provided novel information regarding the effects of topiramate on cocaine- and ethanol-related behaviours and metabolism, and we presented novel insights regarding the changes in the expression of the genes controlling the epigenetic mechanisms (epigenetic genes) and genes related directly to the reward system in the prefrontal cortex.

Acknowledgements

This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria (Red de Trastornos Adictivos, FEDER, RD12/0028/0015 to J.A.L.M., RD12/0028/001 to F.R. de F., RD12/0028/0014 to R.N.), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2011-26818 to J.A.L.M.), and the European Foundation for Alcohol Research (EA 12 21 to J.A.L.M.).

Conflict of interest

None.

References

- Abernathy K, Chandler LJ, Woodward JJ (2010). Alcohol and the prefrontal cortex. *Int Rev Neurobiol* 91: 289–320.
- AEMPS (Spanish Agency for Medicines and Health Products) (2012). Topamax data sheet. Available at: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/63960/FT_63960.pdf (accessed 6/8/2013).
- Alén F, Gómez R, González-Cuevas G, Navarro M, López-Moreno JA (2009). Nicotine causes opposite effects on alcohol intake: evidence

in an animal experimental model of abstinence and relapse from alcohol. *Nicotine Tob Res* 11: 304–311.

Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M, Peters JA, Harmar AJ and CGTP Collaborators (2013a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G-protein coupled receptors. *Br J Pharmacol* 170: 1459–1581.

Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M, Peters JA, Harmar AJ and CGTP Collaborators (2013b). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Ligand-gated ion channels. *Br J Pharmacol* 170: 1582–1607.

Antoniou K, Kafetzopoulos E, Papadopoulou-Daifoti Z, Hyphantis T, Marselos M (1998). D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 189–196.

Balda MA, Anderson KL, Itzhak Y (2009). The neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene contributes to the regulation of tyrosine hydroxylase (TH) by cocaine. *Neurosci Lett* 457: 120–124.

Bestor TH (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9: 2395–2402.

Bevins RA, Besheer J (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 1: 1306–1311.

Botia B, Legastelois R, Alaux-Cantin S, Naassila M (2012). Expression of ethanol-induced behavioral sensitization is associated with alteration of chromatin remodeling in mice. *PLoS ONE* 7: e47527.

Braga MF, Aroniadou-Anderjaska V, Li H, Rogawski MA (2009). Topiramate reduces excitability in the basolateral amygdala by selectively inhibiting GluK1 (GluR5) kainate receptors on interneurons and positively modulating GABAA receptors on principal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 330: 558–566.

Breslin FJ, Johnson BA, Lynch WJ (2010). Effect of topiramate treatment on ethanol consumption in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 207: 529–534.

Cagetti E, Baicy KJ, Olsen RW (2004). Topiramate attenuates withdrawal signs after chronic intermittent ethanol in rats. *Neuroreport* 15: 207–210.

Dayas CV, Liu X, Simms JA, Weiss F (2007). Distinct patterns of neural activation associated with ethanol seeking: effects of naltrexone. *Biol Psychiatry* 61: 979–989.

Dobi A, Seabold GK, Christensen CH, Bock R, Alvarez VA (2011). Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal. *J Neurosci* 31: 1895–1904.

Echeverry-Alzate V, Tuda-Arízuncun M, Bühler KM, Santos Á, Giné E, Olmos P *et al.* (2012). Cocaine reverses the naltrexone-induced reduction in operant ethanol self-administration: the effects on immediate-early gene expression in the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 63: 927–935.

Ennaceur A, Michalikova S, Bradford A, Ahmed S (2005). Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav Brain Res* 159: 247–266.

FDA (Food and Drug Administration) (1995). Topamax Review and Evaluation of Pharmacology and Toxicology. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/96/020505_000_Pharm-toxicology_rvw.pdf (accessed 6/8/2013).

FDA (Food and Drug Administration) (1996). Topamax tablets approval letter. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/96/020505s000_Topamax.cfm (accessed 6/8/2013).

FDA (Food and Drug Administration) (2012). Medication guide. Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails> (accessed 6/8/2013).

Gasior M, Ungard JT, Witkin JM (1999). Preclinical evaluation of newly approved and potential antiepileptic drugs against cocaine-induced seizures. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 1148–1156.

Ghasemzadeh MB, Vasudevan P, Mueller C (2009). Locomotor sensitization to cocaine is associated with distinct pattern of glutamate receptor trafficking to the postsynaptic density in prefrontal cortex: early versus late withdrawal effects. *Pharmacol Biochem Behav* 92: 383–392.

Hargreaves GA, McGregor IS (2007). Topiramate moderately reduces the motivation to consume alcohol and has a marked antidepressant effect in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 31: 1900–1907.

Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF (2010). Dnmt1/transcription factor interactions: an alternative mechanism of DNA methylation inheritance. *Genes Cancer* 1: 434–443.

Host L, Dietrich JB, Carouge D, Aunis D, Zwiller J (2011). Cocaine self-administration alters the expression of chromatin-remodelling proteins; modulation by histone deacetylase inhibition. *J Psychopharmacol* 25: 222–229.

Innocenti A, Villar R, Martinez-Merino V, Gil MJ, Scozzafava A, Vullo D *et al.* (2005). Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with benzo[b]thiophene 1,1-dioxide sulphonamides. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 4872–4876.

Johnson BA (2004). Uses of topiramate in the treatment of alcohol dependence. *Expert Rev Neurother* 4: 751–758.

Johnson BA (2005). Recent advances in the development of treatments for alcohol and cocaine dependence: focus on topiramate and other modulators of GABA or glutamate function. *CNS Drugs* 19: 873–896.

Johnson BA, Ait-Daoud N, Bowden CL, DiClemente CC, Roache JD, Lawson K (2003). Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomized controlled trial. *Lancet* 361: 1677–1685.

Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Gunderson EW, Haughey HM, Wang XQ *et al.* (2013). Topiramate's effects on cocaine-induced subjective mood, craving and preference for money over drug taking. *Addict Biol* 18: 405–416.

Kampman KM, Pettinati H, Lynch KG, Dackis C, Sparkman T, Weigley C *et al.* (2004). A pilot trial of topiramate for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* 75: 233–240.

Kampman KM, Pettinati HM, Lynch KG, Spratt K, Wierzbicki MR, O'Brien CP (2013). A double-blind, placebo-controlled trial of topiramate for the treatment of comorbid cocaine and alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend* 133: 94–99.

Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting *in vivo* experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.

Knapp CM, Mercado M, Markley TL, Crosby S, Ciraulo DA, Kornetsky C (2007). Zonisamide decreases ethanol intake in rats and mice. *Pharmacol Biochem Behav* 87: 65–72.

Kreek MJ, Levran O, Reed B, Schlussman SD, Zhou Y, Butelman ER (2012). Opiate addiction and cocaine addiction: underlying molecular neurobiology and genetics. *J Clin Invest* 122: 3387–3393.

Lawhorn C, Edusei E, Zhou Y, Ho A, Kreek MJ (2013). Acute binge pattern cocaine administration induces region-specific effects in D1-r- and D2-r-expressing cells in eGFP transgenic mice. *Neuroscience* 253: 123–131.

- Le Foll B, Justinova Z, Wertheim CE, Barnes C, Goldberg SR (2008). Topiramate does not alter nicotine or cocaine discrimination in rats. *Behav Pharmacol* 19: 13–20.
- Liu K, Steketee JD (2011). Repeated exposure to cocaine alters medial prefrontal cortex dopamine D₂-like receptor modulation of glutamate and dopamine neurotransmission within the mesocorticolimbic system. *J Neurochem* 119: 332–341.
- Liu X, Gao Q, Li P, Zhao Q, Zhang J, Li J *et al.* (2013). UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9. *Nat Commun* 4: 1563.
- Lüscher C, Malenka RC (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69: 650–663.
- Lynch WJ, Bond C, Breslin FJ, Johnson BA (2011). Severity of drinking as a predictor of efficacy of the combination of ondansetron and topiramate in rat models of ethanol consumption and relapse. *Psychopharmacology (Berl)* 217: 3–12.
- Maryanoff BE, Gardocki JF (1985). Anticonvulsant sulfamate derivatives. US Patent no. 4 513 006, USA.
- Maryanoff BE, Nortey SO, Gardocki JF, Shank RP, Dodgson SP (1987). Anticonvulsant O-alkyl sulfamates. 2,3:4,5-bis-O-(1-methylethylidene)-beta-D-fructopyranose sulfamate and related compounds. *J Med Chem* 30: 880–887.
- McGrath JC, Drummond GB, McLachlan EM, Kilkenney C, Wainwright CL (2010). Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1573–1576.
- Nakamura F, Hiyoshi T, Kudo T, Yagi K, Seino M (1993). Anticonvulsant effect of topiramate [2,3:4,5-bis-O-(1-methylethylidene)-beta-D-fructopyranose sulfate] on amygdaloid kindled seizures in the cat. *Jpn J Psychiatry Neurol* 47: 394–395.
- Navarrete F, Pérez-Ortiz JM, Manzanares J (2012). Pregabalin- and topiramate-mediated regulation of cognitive and motor impulsivity in DBA/2 mice. *Br J Pharmacol* 167: 183–195.
- Nguyen SA, Malcolm R, Middaugh LD (2007). Topiramate reduces ethanol consumption by C57BL/6 mice. *Synapse* 61: 150–156.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247–257.
- Parsegian A, See RE (2014). Dysregulation of dopamine and glutamate release in the prefrontal cortex and nucleus accumbens following methamphetamine self-administration and during reinstatement in rats. *Neuropsychopharmacology* 39: 811–822.
- Paxinos G, Watson C (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edn. Academic Press: San Diego, CA.
- Perkins A, Lehmann C, Lawrence RC, Kelly SJ (2013). Alcohol exposure during development: impact on the epigenome. *Int J Dev Neurosci* 31: 391–397.
- Reis AD, Castro LA, Faria R, Laranjeira R (2008). Craving decrease with topiramate in outpatient treatment for cocaine dependence: an open label trial. *Rev Bras Psiquiatr* 30: 132–135.
- Robison AJ, Nestler EJ (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* 12: 623–637.
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 25: 269–277.
- Rubio G, Ponce G, Jiménez-Arriero MA, Palomo T, Manzanares J, Ferre F (2004). Effects of topiramate in the treatment of alcohol dependence. *Pharmacopsychiatry* 37: 37–40.
- Schermelleh L, Haemmer A, Spada F, Rösing N, Meilinger D, Rothbauer U *et al.* (2007). Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 35: 4301–4312.
- Schindler CW, Goldberg SR (2012). Accelerating cocaine metabolism as an approach to the treatment of cocaine abuse and toxicity. *Future Med Chem* 4: 163–175.
- Schmidt HD, Pierce RC (2010). Cocaine-induced neuroadaptations in glutamate transmission: potential therapeutic targets for craving and addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1187: 35–75.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101–1108.
- Schneider K, Fuchs C, Dobay A, Rottach A, Qin W, Wolf P *et al.* (2013). Dissection of cell cycle-dependent dynamics of Dnmt1 by FRAP and diffusion-coupled modeling. *Nucleic Acids Res* 41: 4860–4876.
- Shinn AK, Greenfield SF (2010). Topiramate in the treatment of substance-related disorders: a critical review of the literature. *J Clin Psychiatry* 71: 634–648.
- Sommer BR, Mitchell EL, Woolie TE (2013). Topiramate: effects on cognition in patients with epilepsy, migraine headache and obesity. *Ther Adv Neurol Disord* 6: 211–227.
- Stromberg MF, Mackler SA (2005). The effect of cocaine on the expression of motor activity and conditioned place preference in high and low alcohol-preferring Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 82: 314–319.
- Tatum WO, Kaplan PW, Jallon P (2009). *Epilepsy A to Z: A Concise Encyclopedia*, 2nd edn. Demos Medical Pub: New York.
- US NIH (US National Institutes of Health) (2009) ClinicalTrials.gov. Available at: <http://www.clinicaltrials.gov> (accessed 6/8/2013).
- Vengeliene V, Celerier E, Chaskiel L, Penzo F, Spanagel R (2009). Compulsive alcohol drinking in rodents. *Addict Biol* 14: 384–396.
- Warnault V, Darcq E, Levine A, Barak S, Ron D (2013). Chromatin remodeling – a novel strategy to control excessive alcohol drinking. *Transl Psychiatry* 3: e231.
- Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ (2008). Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1055–1070.
- Zalewska-Kazubaska J, Gorska D, Dyr W, Czarnecka E (2007). Effect of repeated treatment with topiramate on the beta-endorphin plasma level in rats selectively bred for high and low alcohol preference. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 525–528.
- Zalewska-Kazubaska J, Bajer B, Gorska D, Andrzejczak D, Dyr W, Bieńkowski P (2013). Effect of repeated treatment with topiramate on voluntary alcohol intake and beta-endorphin plasma level in Warsaw alcohol high-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl)* 225: 275–281.

IV. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados presentados en esta tesis doctoral aportan nuevos datos sobre la compleja interacción entre el alcohol y la cocaína, la eficacia de varios tratamientos farmacológicos en esta codependencia, y la implicación de la corteza prefrontal en la respuesta a estos tratamientos. Se trata de un tema de gran relevancia, como se ha expuesto anteriormente, ya que el consumo simultáneo de estas drogas es frecuente en la población general, por todas las consecuencias que esta práctica puede desencadenar, y por la ausencia de tratamientos farmacológicos efectivos en la codependencia de alcohol y cocaína. Dentro de este ámbito, los distintos estudios incluidos en la tesis abordan varias cuestiones fundamentales que incluyen: 1) los efectos de la administración de cocaína sobre la autoadministración operante de alcohol en ratas Wistar; 2) la eficacia de diferentes tratamientos farmacológicos en la reducción del consumo de alcohol, tanto en los animales que son expuestos solamente a la autoadministración alcohol como en aquellos que se encuentran bajo la administración concomitante de alcohol y cocaína; 3) los efectos del tratamiento farmacológico con naltrexona y topiramato sobre la estimulación psicomotora inducida por la cocaína, así como sobre el metabolismo del alcohol y de la cocaína; y 4) las consecuencias de las distintas condiciones experimentales sobre la expresión de varios grupos de genes en la CPF de la rata, con especial interés en genes relacionados con los mecanismos de regulación de la expresión génica.

1. Efectos de la administración crónica de cocaína sobre el consumo de alcohol

En primer lugar, y como parte importante del modelo de ingesta de alcohol que se presenta en los dos estudios que conforman esta tesis, observamos de manera repetida un incremento en el consumo de alcohol inducido por la cocaína. Este aumento aparece entorno al sexto día de administración intraperitoneal (i.p.) de cocaína (20 mg/kg). Knackstedt et al. (2006) encontraron un efecto similar, de forma que los animales pretratados con cocaína intravenosa (i.v.), de manera crónica, bebían significativamente más alcohol. También, en un modelo de autoadministración i.v. de alcohol/cocaína, Ikegami et al. (2002) observaron que las ratas con exposición previa a estas 2 drogas se autoadministraban más alcohol (i.v) que las ratas expuestas solamente a cocaína.

Por el contrario, Cailhol y Mormède (2000) no encontraron efectos significativos de la administración i.p. de cocaína sobre el consumo de alcohol en ratas, y Uemura et al. (1998) muestran una disminución del consumo de alcohol inducida por la cocaína (i.p.)

en ratones. Estos datos contradictorios podrían ser fruto de las diferencias metodológicas aplicadas, principalmente de las dosis utilizadas en cada estudio y de los días de tratamiento con cocaína, lo que pone de manifiesto la complejidad de los efectos que produce la cocaína sobre el consumo de alcohol.

Otro punto a tener en cuenta al observar estos efectos, y que hemos justificado en cada uno de nuestros estudios, es el tiempo transcurrido entre la administración de cocaína y la exposición a alcohol, en nuestro caso de unas 17 horas. Como explicamos en el Artículo 1, con este intervalo de tiempo buscamos evitar los efectos de la administración concomitante de alcohol y cocaína, entre los que se encuentran: a) la sensibilización motora inducida por la cocaína mientras los animales estuviesen en las cajas de autoadministración de alcohol (Stromberg y Mackler, 2005), b) una posible aversión al alcohol inducida por la cocaína, ya que otros autores han demostrado este efecto en el caso de la sacarina (Davis y Riley, 2007; Goudie et al., 1978), y c) la formación de cocaetileno (ver apartado 5.1. de la introducción), en la medida de lo posible. En este sentido, y aunque nosotros no medimos los niveles de cocaetileno, Knackstedt et al. (2006) no encontraron este metabolito en sangre, 40 minutos después de la administración de alcohol + cocaína, concluyendo que el incremento del consumo de alcohol inducido por la cocaína, en las ratas de su estudio, no podía ser explicado por la formación de cocaetileno.

En un estudio reciente, Hauser et al. (2014) utilizaron una dosis aguda de cocaína (i.p.) y encuentran datos que irían en la misma línea que los nuestros, de forma que esta droga a dosis bajas produce un aumento de la conducta de búsqueda de alcohol que puede durar al menos 4 horas, y hasta 24 horas si las dosis de cocaína son altas. Estos autores añaden, como apuntan otros estudios (Mckee and Meshul, 2005; Ungless et al., 2001), que la mayor activación que produce la cocaína en ciertas vías neuronales podría ser la base del efecto duradero sobre la conducta de búsqueda de alcohol.

2. Respuesta a los tratamientos farmacológicos en el consumo de alcohol con/sin coadministración de cocaína

Los dos estudios que se presentan en esta tesis doctoral incluyen varios experimentos en los que se investiga la eficacia de 3 tratamientos farmacológicos (acamprosato, naltrexona, y topiramato) en la reducción del consumo de alcohol en ratas Wistar, en un

modelo de autoadministración operante de alcohol con o sin administración concomitante de cocaína.

2.1. Efectos sobre el consumo de alcohol sin coadministración de cocaína

El *acamprosato* (Artículo 1) no produjo cambios significativos en el consumo de alcohol de los animales, en ninguna de las dosis estudiadas (35, 70, o 210 mg/kg). Estos resultados son congruentes con los obtenidos en humanos en dos importantes estudios realizados en Estados Unidos y Alemania, COMBINE (Anton et al., 2006) y PREDICT (Mann et al., 2013) respectivamente. Sin embargo, como ha sido expuesto en apartados anteriores, hay numerosos estudios previos que muestran los efectos positivos de este fármaco. Algunas de las posibles explicaciones para estas discrepancias en los resultados son expuestas en un reciente metanálisis (Maisel et al., 2013) posterior a nuestro estudio en el que se demostró que las variables más importantes que afectaron a la eficacia del acamprosato estaban relacionadas con la desintoxicación de los sujetos previa al ensayo y con tener la abstinencia como objetivo del tratamiento. En otro metanálisis (Cochrane) con 24 ensayos controlados aleatorios, que incluían a casi 7000 pacientes, el acamprosato incrementó la duración acumulada de abstinencia y redujo el riesgo de consumo de alcohol (Rösner et al., 2010).

El objeto de nuestro estudio se centró en la eficacia del tratamiento con acamprosato mientras los animales consumían alcohol de forma crónica, y bajo esa premisa no encontramos efecto significativo en las dosis estudiadas. Estos resultados van en la misma dirección que los encontrados en humanos, dado que el acamprosato no parece ser eficaz en la reducción de los días de consumo fuerte de alcohol (Witkiewitz et al., 2012).

De manera similar a lo que observamos con el acamprosato, el *topiramato* (Artículo 2) no disminuyó el consumo de alcohol en los animales a ninguna de las dosis estudiadas (2.5-40 mg/kg). Estos datos son congruentes con los obtenidos por Breslin et al. (2010) y Moore et al. (2014), quienes tampoco encontraron efectos del topiramato sobre el consumo de alcohol en ratas Wistar. Sin embargo, en varios estudios realizados en ratas preferentes por alcohol, como las ratas *ethanol-preferring* (P) y las *Warsaw high preferring* (WHP), el topiramato produjo una reducción en el consumo de esta droga (Breslin et al., 2010; Lynch et al., 2011; Moore et al., 2014; Zalewska-Kaszubska et al.,

2013). Gabriel y Cunningham (2005) y Knapp et al. (2007) también encontraron que el topiramato reduce el consumo de alcohol en ratones y ratas, respectivamente.

Si nos centramos en los estudios en humanos dependientes de alcohol, se ha visto que el tratamiento con topiramato reduce el consumo de dicha droga (por ej. el número de bebidas por día y los días de consumo fuerte), el *craving*, e incrementa la abstinencia (Blodgett et al., 2014; Johnson et al., 2003, 2007; Miranda et al., 2008; Rubio et al., 2004). Por lo tanto, teniendo en cuenta nuestros datos y los mencionados anteriormente, una hipótesis plausible sobre las diferencias encontradas en la eficacia del topiramato podría incluir variables como el nivel de consumo de alcohol, según muestran los resultados clínicos y preclínicos, y la vulnerabilidad genética (por ej. en las ratas Wistar y en las P). Ambos temas han sido tratados por el grupo de Johnson como posibles indicadores de la eficacia del topiramato en la dependencia de alcohol (Breslin et al., 2010; Lynch et al., 2011).

La **naltrexona** (Artículo 1), por el contrario, sí redujo significativamente el consumo de alcohol en nuestros animales, a la dosis de 10 mg/kg. En concordancia con estos resultados, muchos estudios en roedores han mostrado la eficacia de la naltrexona en la reducción del consumo de alcohol a través de diferentes paradigmas conductuales (Ciccocioppo et al., 2007; Czachowski y DeLory, 2009; Gilpin et al., 2008; Goodwin et al., 2001; Henderson-Redmond y Czachowski, 2014; June et al., 1998; Kim et al., 2004; Le et al., 1999; Stromberg et al., 1998; Verplaetse y Czachowski, 2015; Walker y Koob, 2008). En algunos de estos estudios el consumo de alcohol se vio disminuido utilizando dosis muy bajas de naltrexona en comparación con el nuestro y con otros de los mencionados, lo que podría explicarse según el modelo conductual y la vía de administración del fármaco que se utilizó en cada uno de ellos. En este sentido, Williams y Broadbridge (2009), encontraron que la naltrexona por vía subcutánea (s.c.) es aproximadamente 30 veces más potente que por vía i.p. A su vez, cabe esperar que la vía oral, utilizada en nuestro estudio, sea aún menos potente que la i.p. (DeHaven-Hudkins et al., 1990).

Nuestros resultados también se ven avalados por la eficacia que muestra la naltrexona en los estudios realizados en humanos dependientes de alcohol. En estos sujetos, la naltrexona provocó una reducción en el deseo por consumir (*craving*) y en la cantidad de alcohol consumido (O'Malley et al., 2002), también redujo el riesgo de consumos

fuertes de alcohol, así como los días de consumo (Maisel et al., 2013; Rösner et al., 2010) y la probabilidad de recaída (Volpicelli et al., 1992). En la misma línea, Myrick et al. (2008) encontraron que la naltrexona podía disminuir la activación en la vía del refuerzo inducida por estímulos (claves) relacionados con el alcohol.

Por otra parte, algunos metanálisis han mostrado ciertas limitaciones de este tratamiento farmacológico. Así, Kranzler y Van Kirk (2001) indicaron que la naltrexona podría ser eficaz, pero de forma modesta, en la reducción del consumo de alcohol en sujetos alcohólicos, mientras que Garbutt (2010) reveló su eficacia en la reducción de la recaída al consumo fuerte de alcohol, pero con menor efectividad en el mantenimiento de la abstinencia.

De manera resumida, y como se ha comentado, el acamprosato está indicado para el mantenimiento de la abstinencia en pacientes dependientes de alcohol que sean abstinentes al inicio del tratamiento, y no parece ser eficaz en la reducción de los días de consumo fuerte de alcohol en humanos. Por otra parte, la eficacia del topiramato podría depender del nivel de consumo de alcohol y de la vulnerabilidad genética de los sujetos, siendo más beneficioso en aquellos que presenten un mayor consumo de alcohol. Por último, la naltrexona es efectiva en la reducción del consumo de alcohol y la recaída, pero con menor eficacia en el mantenimiento de la abstinencia. Todos estos hechos parecen sugerir que las propiedades farmacológicas de cada compuesto los vincularían a estadios diferentes del alcoholismo, así como a características específicas del paciente (por ej. consumo fuerte de alcohol, vulnerabilidad genética, etc.).

Por lo tanto podríamos sugerir, como señalan varios estudios, que la integración de estos tratamientos podría resultar útil. Heyser et al. (2003) encuentran que la combinación de naltrexona y acamprosato puede ser más efectiva que cada compuesto por separado en la prevención del efecto de privación de alcohol en ratas. La combinación de estos dos fármacos también fue más efectiva en la reducción del consumo de alcohol en ratones (Kim et al., 2004), y mostró ser conductualmente y farmacológicamente segura en humanos (Johnson et al., 2003b). Dos estudios clínicos también han demostrado que dicha combinación puede ser más efectiva que cada fármaco por separado, en la prevención de la recaída y en la abstinencia de alcohol (Feeney et al., 2006; Kiefer et al., 2003).

Otros estudios recientes están explorando la combinación topiramato/naltrexona. Así, Moore et al. (2014) observaron mayor eficacia de dicha combinación, con respecto a la de cada fármaco por separado en ratas P, y con un mayor efecto de esta combinación en los machos que en las hembras (Moore y Lynch, 2015). En la misma línea, el tratamiento con topiramato/naltrexona en ratones provocó una mayor reducción tanto en el consumo de alcohol como en la motivación por beber (Navarrete et al., 2013). Por último, y en esta misma dirección, se está desarrollando un estudio piloto reciente (fase I), en el que se estudia la seguridad y eficacia de esta combinación en el tratamiento del alcoholismo en sujetos dependientes (ClinicalTrials.gov). Los resultados aún no han sido publicados.

2.2. Efectos sobre el consumo de alcohol con coadministración de cocaína

En el estudio 1, la *naltrexona* no fue capaz de reducir el incremento en el consumo de alcohol inducido por la cocaína, a pesar de ser efectiva en ausencia de la misma. Aunque en la literatura científica hay resultados contradictorios con respecto al uso de la naltrexona en la co-dependencia de alcohol y cocaína, nuestros datos concuerdan con algunos de los comentados en el apartado 6.3 de la introducción de esta tesis, como el estudio piloto de Pettinati et al. (2014).

Aunque las razones que justifiquen esta falta de efecto de la naltrexona siguen sin estar claras, una posible explicación sería que los cambios neurobiológicos inducidos por la cocaína superan a los que son inducidos por la naltrexona. En este sentido, la naltrexona muestra mayor afinidad por los receptores μ opioides que por los κ o δ (Mannelli et al., 2011) y, como se ha explicado anteriormente, la activación de los receptores μ puede aumentar indirectamente la liberación de DA, en parte gracias a la inhibición de la liberación de GABA en áreas relevantes del sistema cerebral de recompensa (Corbett et al., 2006; Johnson, 2010). La naltrexona, por lo tanto, bloquearía la activación de los receptores μ producida por el alcohol, así como la síntesis y la liberación de opioides endógenos inducidas por esta droga (Herz, 1997). Sin embargo, la cocaína produce un aumento en los niveles extracelulares de DA en áreas cerebrales de recompensa, mediante el aumento de su liberación y la inhibición de su recaptura. Este aumento de DA provocaría alteraciones en la tasa de transcripción de genes diana [por ej. factores de transcripción (Nestler, 2005)], que terminarían por producir cambios en la actividad

sináptica de las neuronas como la arborización dendrítica y/o en los circuitos neurales, que explicaría los efectos a corto y largo plazo en la conducta.

Siguiendo con la explicación de la falta de efecto de la Naltrexona sobre el incremento del consumo de alcohol producido por la cocaína, es interesante recordar que uno de los cambios producidos por la cocaína descrito en estudios tanto en roedores como en humanos, es el incremento de los receptores μ opioides en distintas áreas implicadas en la adicción. Por ejemplo, se ha visto un aumento de este receptor en la corteza cingulada, el NAc, el estriado dorsal, y en el núcleo basolateral de la amígdala como respuesta al tratamiento crónico con cocaína en ratas (Unterwald et al., 1992, 1994). En un estudio más reciente, Bailey et al. (2005) confirman que el tratamiento crónico con cocaína produce una regulación al alza de los receptores μ en las cortezas frontal y cingulada, y en el caudado-putamen de la rata. Estos cambios permanecieron al menos 14 días después del inicio de la abstinencia.

Encontramos resultados similares en estudios en humanos que sugieren este incremento de receptores μ con el consumo de cocaína. Así, en humanos dependientes de cocaína también se ha demostrado, mediante PET in vivo (tomografía por emisión de positrones), un incremento de la unión a los receptores μ en varias regiones cerebrales (incluyendo las cortezas frontal y cingulada anterior), cambios que persistieron después de 4 semanas de abstinencia (Zubieta et al., 1996). Gorelick et al. (2005) también observaron en consumidores de cocaína un incremento de la unión a estos receptores (mediante PET) en estructuras como la corteza frontal, correlacionando con la cantidad de cocaína consumida, con el porcentaje de días de consumo, y con la concentración del metabolito benzoilecgonina en orina. Los resultados obtenidos por Ghitza et al. (2010) y Gorelick et al. (2008) en humanos consumidores de cocaína irían en la misma línea, sugiriendo además que la regulación al alza de estos receptores en distintas áreas puede servir como indicador de los resultados del tratamiento y del tiempo de recaída al consumo de esta droga.

Apoyando estos resultados, en el estudio 2 de esta tesis también encontramos incrementados los niveles de ARNm del receptor μ en la CPF de los animales tratados con alcohol/cocaína (Fig. 4E, Artículo 2). Por lo tanto, podríamos sugerir, con respecto al estudio 1, que la dosis de naltrexona (10 mg/kg) que fue efectiva en la reducción del consumo de alcohol en ausencia de cocaína, no lo fue en su presencia, porque sería

necesaria una dosis mayor para hacer frente al incremento de receptores μ que se induce por la administración crónica de cocaína. También se puede contemplar la elección de un tratamiento farmacológico similar a la naltrexona en esta interacción alcohol/cocaína, por ejemplo el *nalmefeno*, ya que éste presenta una unión más efectiva a los receptores opioides centrales, más alta biodisponibilidad, y una duración de la acción más prolongada que la naltrexona (ver apartado 6.1 de la introducción).

La respuesta que observamos en el estudio 2 con el *topiramato* fue diferente a la encontrada con la naltrexona, es decir que mientras el topiramato no produjo ninguna disminución del consumo de alcohol en los animales sin cocaína concomitante, sí redujo el incremento en el número de respuestas por alcohol que fue inducido por cocaína, hasta alcanzar el nivel de los animales sin coadministración de cocaína. En la misma línea, en un estudio de Johnson et al. (2013a) encontraron que el topiramato podía reducir el riesgo de abuso de cocaína cuando se trataba del consumo de dosis altas de la misma. Por otro lado, aunque Kampman et al. (2013) no encontraron beneficios del topiramato en la reducción del consumo de alcohol ni en el de cocaína en sujetos dependientes de ambas drogas, este tratamiento aumentaba la probabilidad de tener una abstinencia más prolongada de cocaína, beneficiando más a los sujetos con síntomas más severos de abstinencia.

En nuestro estudio, la efectividad del topiramato fue observada únicamente cuando el fármaco era administrado previamente a la sesión de autoadministración de alcohol. Este beneficio no se observó al administrar el topiramato antes de la administración de cocaína, por lo que parece más razonable asumir que el topiramato bloquea la expresión de los efectos inducidos por la cocaína sobre el consumo de alcohol, y no la adquisición de dichos efectos.

En este sentido, se ha visto que las inyecciones repetidas de cocaína son suficientes para desencadenar adaptaciones en las sinapsis glutamatérgicas en el NAc (Dobi et al., 2011), las proyecciones glutamatérgicas de la CPF modulan el NAc, siendo necesaria la transmisión glutamatérgica en la vía cortico-estriatal para la expresión de conductas motivadas asociadas con la cocaína y otras drogas de abuso (McFarland et al., 2003; Parsegian y See, 2014). Los datos también sugieren la transmisión de los receptores de glutamato AMPA en el NAc como un punto clave para las conductas relacionadas con la cocaína (Wolf, 2010; Wolf y Ferrario, 2010). De manera similar, la cocaína induce

cambios en la expresión de los receptores NMDA en distintas áreas del sistema mesocorticolímbico (Ortinski, 2014), y afecta al sistema GABAérgico en la CPF y otras áreas (Jayaram y Steketee, 2004; Xi et al., 2003).

Todo lo anterior adquiere más relevancia si se tienen en cuenta los efectos del alcohol sobre los sistemas GABAérgico y glutamatérgico en distintas áreas del sistema cerebral de recompensa (Johnson, 2004), así como los mecanismos de acción del topiramato mencionados en la introducción de esta tesis. En concreto, hay que señalar las acciones neuroquímicas duales del topiramato, ya que facilita la actividad GABAérgica y produce un antagonismo de las vías glutamatérgicas de AMPA y kainato, lo que podría suprimir la actividad dopaminérgica cortico-mesolímbica inducida por drogas como el alcohol (Johnson, 2004). Por lo tanto, como propone este mismo autor, el topiramato podría restaurar o normalizar la sensibilización neuronal producida por el consumo repetido de las drogas, siendo conceptualmente atractivo para el tratamiento de la dependencia y abstinencia de alcohol, y para el tratamiento de la dependencia de cocaína, y quizás del estado de abstinencia de la misma (Johnson, 2005). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, de forma que el topiramato podría estar ajustando la actividad cortico-mesolímbica, dando como resultado una disminución del *craving* y de los efectos reforzantes del alcohol. Pero, aunque para esto no podemos proporcionar una respuesta inequívoca, los datos de nuestro segundo estudio apoyan la eficacia potencial que puede tener el topiramato en el caso de la dependencia dual de alcohol y cocaína.

Teniendo en consideración los resultados de nuestros 2 estudios y todos los datos expuestos en este apartado, y en el anterior (2.1), cabría sugerir la combinación de naltrexona y topiramato para el tratamiento de la codependencia de alcohol/cocaína, siendo un campo aún sin explorar en estudios preclínicos ni clínicos.

3. Efectos de los tratamientos sobre la actividad locomotora

En los 2 estudios presentados en esta tesis doctoral evaluamos los efectos motores de los tratamientos farmacológicos a las dosis seleccionadas con la finalidad de descartar alteraciones motoras que afectaran a los animales durante la sesión de autoadministración de alcohol. Ni la naltrexona a la dosis de 10 mg/kg (Figura 5, Artículo 1), ni el topiramato, a las dosis 2.5-40 mg/kg (Figura 1B, Artículo 2), produjeron alteraciones en la actividad motora de los animales.

Sin embargo, el tratamiento repetido con cocaína (10 y 20 mg/kg) incrementó significativamente la actividad motora de los animales en ambos estudios, lo que replica los resultados obtenidos previamente por otros autores (Ago et al., 2008). Este aumento duradero de la actividad motora que ocurre con la exposición repetida a cocaína se conoce como sensibilización conductual (Jayaram y Steketee, 2004). En nuestro caso, no observamos, en ninguno de los estudios, alteraciones motoras inducidas por la cocaína que afectaran al número de respuestas de los animales en el momento de la autoadministración de alcohol (17 horas post-inyección de cocaína).

Muchos de los estudios acerca de los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la sensibilización inducida por cocaína se centran en el ATV y el NAc, áreas que están implicadas en el inicio y la expresión de la sensibilización, respectivamente (Kalivas y Stewart, 1991; Robinson y Berridge, 1993). Sin embargo el papel de la CPF está siendo cada vez más estudiado, ya que esta estructura modula el sistema mesocorticolímbico. La CPF recibe aferencias desde el ATV y envía inervaciones glutamatérgicas al ATV y NAc, donde la sensibilización inducida por cocaína produce un aumento en las respuestas de DA (Liu y Steketee, 2011; Steketee, 2005). También el sistema opioide endógeno ha sido relacionado con la hiperactividad inducida por cocaína. Por ejemplo, el pretratamiento con *naloxona*, otro antagonista opioide, bloqueó completamente el incremento de la actividad locomotora inducido por la cocaína en ratas (Houdi et al., 1989). De manera similar, el pretratamiento con naltrexona impidió el desarrollo de esta sensibilización motora (Sala et al., 1995), y el tratamiento crónico con este fármaco atenuó ligeramente el incremento de la actividad locomotora inducido por la cocaína crónica en ratas (Kunko et al., 1998). Además, Smith et al. (2009) muestran datos sobre sensibilización cruzada entre opioides y cocaína que van en la misma línea.

En nuestros experimentos, ninguno de los tratamientos principales (naltrexona y topiramato) alteró la hiperactividad locomotora inducida por la cocaína, aunque algunos de los estudios anteriormente mencionados podrían indicar lo contrario. Sin embargo, otros estudios en roedores encuentran resultados similares a los nuestros en relación a la naltrexona (Lesscher et al., 2005; Sable et al., 2004). Bajo nuestra interpretación, las neuroadaptaciones inducidas por la cocaína serían mínimamente afectadas por la naltrexona. Otros autores sugieren que la naltrexona bloquearía los efectos de la administración intermitente de cocaína sólo cuando esta última deja de estar presente y la naltrexona continúa actuando (Kunko et al., 1998). En lo que respecta al topiramato y

sus efectos sobre la sensibilización motora inducida por cocaína, es llamativa la falta de estudios al respecto, y aún más si se tienen en cuenta las acciones duales de este fármaco sobre la señalización GABAérgica y glutamatérgica anteriormente mencionadas, y su posible interacción con el sustrato neurobiológico implicado en dicha conducta.

4. Corteza prefrontal y expresión génica

Uno de los principales objetivos de esta tesis fue el estudio de los efectos del tratamiento con naltrexona y topiramato, y la interacción alcohol/cocaína, sobre la expresión génica en la CPF de la rata. Aunque en cada uno de los estudios nos centramos en diferentes familias de genes, estas tienen mucha relación entre sí. Mientras que en el artículo 1 los IEGs fueron nuestro foco de atención, con especial interés por la categoría de los factores de transcripción, en el artículo 2 nos centramos en genes relacionados con mecanismos epigenéticos y con el sistema cerebral de recompensa.

Los procesos implicados en la regulación de la expresión génica son variados y complejos, e incluyen la activación y la inhibición de factores de transcripción, la modificación de la estructura de la cromatina y el ADN, y la inducción de ARNs no codificantes. Como sugieren nuestros datos, y como otros autores han propuesto anteriormente (Nestler, 2001; Robison y Nestler, 2011), estos procesos pueden dar lugar a cambios en el potencial transcripcional de genes, contribuyendo de manera substancial a muchas de las neuroadaptaciones producidas por la exposición crónica a drogas de abuso.

La CPF, al igual que otras regiones del sistema cerebral de recompensa, muestra alteraciones en la expresión de muchos genes tras la administración crónica de drogas. Como fue expuesto en la introducción, además de tratarse de una estructura implicada en la conducta adictiva (Lüscher y Malenka, 2011), juega un importante papel en muchos otros procesos cognitivo-conductuales (Abernathy et al., 2010; Goldstein y Volkow, 2011; Ranganath y Jacob, 2015). Por otra parte, distintos estudios han mostrado que la CPF es sensible al tratamiento con los fármacos utilizados en nuestros experimentos -acamprosato, naltrexona, y topiramato- (Burattini et al., 2008; Dayas et al., 2007; Hu et al., 2015; Li et al., 2010; Navarrete et al., 2012).

Dentro de los IEGs analizados, la autoadministración operante de alcohol incrementó la expresión de 2 genes efectores, *COX-2* y *Homer1a*, los cuales influyen directamente en funciones celulares (Lanahan y Worley, 1998). Por el contrario, esta exposición crónica al alcohol provocó una reducción en la expresión de un factor de transcripción, *C-fos*, y esta alteración se mantuvo con la exposición crónica a cocaína y al tratamiento con naltrexona. Estos resultados son congruentes con otros estudios que muestran una inducción rápida y transitoria de la proteína c-Fos, o su ARNm, en varias áreas cerebrales tras el tratamiento agudo con drogas como el alcohol o la cocaína. Sin embargo, y como muestran nuestros datos, el tratamiento crónico con la droga parece revertir este efecto (Chang et al., 1995; Vilpoux et al., 2009; Nestler, 2001; Moratalla et al., 1996). Además, esta reducción de la expresión de *C-fos* en la CPF, resultado del tratamiento crónico con alcohol o alcohol/cocaína, fue replicado en el segundo estudio de esta tesis (datos no publicados).

Sin embargo, la exposición crónica a drogas, como el alcohol o la cocaína, produce el efecto opuesto sobre los niveles de Δ FosB en distintas áreas, incluyendo la CPF (Nestler, 2001; Perrotti et al., 2008; Robison y Nestler, 2011). Δ FosB es un factor de transcripción miembro de la familia Fos que ha sido implicado en la plasticidad neural asociada a la adicción. Un estudio de Li et al. (2010) mostró que el tratamiento con naltrexona redujo tanto el consumo de alcohol en ratas como el incremento de Δ FosB en la CPF inducido por el consumo crónico de dicha droga. Por lo tanto, aunque nosotros no observamos una “normalización” en *C-fos* con la naltrexona, cabría la posibilidad de observar estos cambios en Δ FosB, dado que se trata de isoformas más estables. La exploración de estos factores de transcripción en la CPF, y otras áreas, tras la exposición al alcohol, la cocaína, o ambas drogas, podría aportar datos acerca de su implicación en la mayor o menor eficacia de los tratamientos farmacológicos, como la naltrexona o el topiramato, tanto en la dependencia de cada una de las drogas como en la dependencia dual.

Los efectos del alcohol y la cocaína sobre los mecanismos de control de la expresión génica, como se ha comentado anteriormente, no se limitan a los factores de transcripción. También, los distintos mecanismos epigenéticos expuestos en la introducción de esta tesis juegan un papel importante en los cambios inducidos por estas drogas sobre la expresión de genes en el cerebro y la conducta, sin dejar de lado las

distintas formas de interacción que hay entre los factores de transcripción y los mecanismos epigenéticos (Renthal y Nestler, 2008).

En concreto, la metilación de las regiones promotoras del ADN se ha correlacionado con el silenciamiento de genes, de forma que la modificación química del ADN estaría interfiriendo con la unión de factores de transcripción (por ej. c-Fos, Δ FosB, CREB, entre otros) y atraería proteínas que contienen dominios de unión a grupos metilo, que actuarían como represores transcripcionales (Jaenisch y Bird, 2003). Anier et al. (2010), por ejemplo, encuentran que la cocaína provoca una hipometilación y menor unión de MeCP2 en el área promotora de *fosB*, lo que se asocia con una regulación al alza de la transcripción de este gen en el NAc. Aunque hay que tener en cuenta que la metilación del ADN es un proceso dinámico y puede promover o reprimir la expresión génica (Suzuki y Bird, 2008).

En el estudio con topiramato (Artículo 2) observamos un incremento en la expresión de las ARN/ADN metiltransferasas (*Trdm1*, *Dnmt1* y *Dnmt3a*) en la CPF producido por la autoadministración crónica de alcohol. Este aumento en los niveles de ARNm fue prevenido, o revertido, por el tratamiento con topiramato y/o cocaína, siendo nuestros datos la única referencia sobre este efecto hasta la fecha.

Los resultado hasta ahora obtenidos en pacientes sobre la metilación del ADN son contradictorios, mientras que algunos estudios informan de una hipermetilación en pacientes dependientes de alcohol (Bleich y Hillemacher, 2009), otros encuentran una hipometilación en los genes investigados (Nieratschker et al., 2013; Zhang et al., 2013). En este sentido, Ponomarev (2013) concluye que los efectos del alcohol crónico sobre la metilación del ADN global parecen ser específicos de tejido.

En roedores, se ha visto que la exposición al alcohol durante el desarrollo causa una hipermetilación del ADN global en la CPF e hipocampo (Otero et al., 2012). En un modelo similar, Perkins et al. (2013) encuentran un aumento en la expresión de *Dnmt1* y *Dnmt3a* en el hipocampo. La metilación del ADN global en la CPFm también estaba incrementada en ratas dependientes de alcohol que fueron pre-expuestas a vapor de alcohol, mostrando además un aumento en la expresión de DNMT1 en esta misma área (Barbier et al., 2015).

Por otro lado, Tian et al. (2012) informan de una hipometilación de ADN global en la CPF inducida por el condicionamiento de lugar preferencial (CLP) con cocaína en ratones. Además, la disminución de la función de la DNMT3a aumenta la respuesta conductual a cocaína, lo que apoyaría la hipótesis que plantea que la reducción de la metilación del ADN promueve el incremento de transcripción génica y contribuiría a la plasticidad conductual inducida por las drogas. En relación a la plasticidad estructural, la DNMT3a tiene un importante papel en el incremento en la densidad de espinas dendríticas inducido por cocaína (LaPlant et al., 2010). Estos datos podrían sugerir que la disminución en la metilación del ADN inducida por la cocaína podría explicar, al menos en parte, el incremento que observamos en la expresión de algunos de los genes estudiados en los animales tratados con cocaína (*Oprm1*, *Th*, *Drd2*, *Grik1*).

Teniendo en cuenta todos estos datos, y la posible hipermetilación e hipometilación del ADN inducidas por el alcohol y la cocaína respectivamente, en nuestro estudio cabría suponer que tanto la cocaína como el topiramato compensarían el aumento de la expresión de las *Dnmts* inducido por el alcohol en la CPF. Sin embargo, para confirmar este supuesto harían falta aún varios estudios que incluyeran la investigación de los efectos de cada tratamiento, y su interacción, sobre la dependencia de alcohol y sobre los distintos mecanismos epigenéticos que estén controlando la expresión de genes específicos, ya que la mayor o menor metilación global, o la regulación de genes implicados en mecanismos generales (por ej. las DNMTs), no implicaría que los distintos tratamientos estén actuando a través de los mismos genes diana. Por otra parte, como era de esperar, las estructuras más estudiadas en relación a los temas centrales de esta tesis son el NAc y el ATV, existiendo pocos estudios que investiguen el papel crítico de la CPF en todas estas interacciones, por lo que se trata de un amplio campo de estudio, dadas las funciones de esta estructura y su implicación en las respuestas observadas en otras áreas cerebrales.

V. CONCLUSIONES FINALES

En respuesta a los objetivos plateados, y con los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. De los tratamientos farmacológicos estudiados, la naltrexona es la única capaz de reducir el consumo de alcohol según nuestras condiciones experimentales.
2. La coadministración crónica de alcohol y cocaína produce un incremento en el consumo de alcohol que solo se ve reducido por el tratamiento con topiramato.
3. La actividad locomotora no se ve afectada por el tratamiento con naltrexona o topiramato. Sin embargo, se observa sensibilización motora inducida por el tratamiento crónico con cocaína que no es alterada por ninguno de los tratamientos farmacológicos.
4. El tratamiento crónico con topiramato aumenta el metabolismo del alcohol independientemente de la presencia de cocaína, y no afecta al metabolismo de esta última.
5. El tratamiento crónico con topiramato en dosis moderadas/altas puede alterar la memoria de tipo episódica.
6. Los cambios en la expresión de *C-fos* en la CPF pueden ser un biomarcador útil en la dependencia de alcohol.
7. El alcohol podría alterar tanto el mantenimiento de los patrones de metilación como la metilación *de novo* en la CPF a través del aumento de la expresión génica de las Dnmts, efecto que es prevenido por la administración de topiramato y/o cocaína, mientras que la cocaína podría estar asociada con un silenciamiento génico mediado por *Hdac2* en esta región cerebral. Además, los efectos conductuales del topiramato/cocaína se ven acompañados por una alteración de la expresión de genes diana implicados en la adicción (*Drd2*, *Th*, y *Oprm1*).

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abernathy K, Chandler LJ, Woodward JJ (2010) Alcohol and the prefrontal cortex. *Int Rev Neurobiol.* 91:289-320.
- Addolorato G, Leggio L (2010) Safety and efficacy of baclofen in the treatment of alcohol-dependent patients. *Curr Pharm Des.* 16(19):2113-7.
- Ago Y, Nakamura S, Baba A, Matsuda T (2008) Neuropsychotoxicity of abused drugs: effects of serotonin receptor ligands on methamphetamine- and cocaine- induced behavioral sensitization in mice. *J Pharmacol Sci.* 106(1):15-21.
- Ahmadi J, Kampman KM, Oslin DM, Pettinati HM, Dackis C, Sparkman T (2009) Predictors of treatment outcome in outpatient cocaine and alcohol dependence treatment. *Am J Addict.* 18(1):81-6.
- Álvarez Y, Farré M (2005) Farmacología de los opioides. *Adicciones.* 17(2):21-40.
- Alving CR, Matyas GR, Torres O, Jalah R, Beck Z (2014) Adjuvants for vaccines to drugs of abuse and addiction. *Vaccine.* 32(42):5382-9.
- Amato L, Minozzi S, Pani PP, Davoli M (2007) Antipsychotic medications for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev.* (3):CD006306.
- Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature.* 431(7006):350-5.
- Anderson AL, Reid MS, Li SH, Holmes T, Shemanski L, Slee A, Smith EV, Kahn R, Chiang N, Vocci F, Ciraulo D, Dackis C, Roache JD, Salloum IM, Somoza E, Urschel HC 3rd, Elkashef AM (2009) Modafinil for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend.* 104(1-2):133-9.
- Anier K, Malinovskaja K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A, Kalda A (2010) DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology.* 35(12):2450-61.
- Anton RF (2008) Genetic basis for predicting response to naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Pharmacogenomics.* 9(6):655-8.
- Anton RF, O'Malley SS, Ciraulo DA, Cisler RA, Couper D, Donovan DM, Gastfriend DR, Hosking JD, Johnson BA, LoCastro JS, Longabaugh R, Mason BJ, Mattson ME, Miller WR, Pettinati HM, Randall CL, Swift R, Weiss RD, Williams LD, Zweben A; COMBINE Study Research Group (2006) Combined pharmacotherapies and behavioral interventions for alcohol dependence: the COMBINE study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 295(17):2003-17.
- Apantaku-Olajide T, Darker CD, Smyth BP (2013) Onset of cocaine use: associated alcohol intoxication and psychosocial characteristics among adolescents in substance abuse treatment. *J Addict Med.* 7(3):183-8.
- Arias AJ, Kranzler HR (2008) Treatment of co-occurring alcohol and other drug use disorders. *Alcohol Res Health.* 31(2):155-67.
- Asevedo E, Mendes AC, Berk M, Brietzke E (2014) Systematic review of N-acetylcysteine in the treatment of addictions. *Rev Bras Psiquiatr.* 36(2):168-75.
- Aubin HJ, Daeppen JB (2013) Emerging pharmacotherapies for alcohol dependence: a systematic review focusing on reduction in consumption. *Drug Alcohol Depend.* 133(1):15-29.

- Ayesta FJ (2002) Bases bioquímicas y neurobiológicas de la adicción al alcohol. *Adicciones*. Vol. 14, Supl. 1.
- Bailey A, Gianotti R, Ho A, Kreek MJ (2005) Persistent upregulation of mu-opioid, but not adenosine, receptors in brains of long-term withdrawn escalating dose "binge" cocaine-treated rats. *Synapse*. 57(3):160-6.
- Baranski JV, Pigeau R, Dinich P, Jacobs I (2004) Effects of modafinil on cognitive and meta-cognitive performance. *Hum Psychopharmacol*. 19(5):323-32.
- Barbier E, Tapocik JD, Juergens N, Pitcairn C, Borich A, Schank JR, Sun H, Schuebel K, Zhou Z, Yuan Q, Vendruscolo LF, Goldman D, Heilig M (2015) DNA methylation in the medial prefrontal cortex regulates alcohol-induced behavior and plasticity. *J Neurosci*. 35(15):6153-64.
- Bart G, Schluger JH, Borg L, Ho A, Bidlack JM, Kreek MJ (2005) Nalmefene induced elevation in serum prolactin in normal human volunteers: partial kappa opioid agonist activity? *Neuropsychopharmacology*. 30(12):2254-62.
- Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S (2008) Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem*. 56(8):711-21.
- Bauer IE, Soares JC, Nielsen DA (2014) The role of opioidergic genes in the treatment outcome of drug addiction pharmacotherapy: A systematic review. *Am J Addict*.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 23(7):781-3.
- Bidlack JM (2014) Mixed μ/κ partial opioid agonists as potential treatments for cocaine dependence. *Adv Pharmacol*. 69:387-418.
- Biliński P, Wojtyła A, Kapka-Skrzypczak L, Chwedorowicz R, Cyranka M, Studziński T (2012) Epigenetic regulation in drug addiction. *Ann Agric Environ Med*. 19(3):491-6.
- Bleich S, Hillemacher T (2009) Homocysteine, alcoholism and its molecular networks. *Pharmacopsychiatry*. 42 Suppl 1:S102-9.
- Blodgett JC, Del Re AC, Maisel NC, Finney JW (2014) A meta-analysis of topiramate's effects for individuals with alcohol use disorders. *Alcohol Clin Exp Res*. 38(6):1481-8.
- Boghdadi MS, Henning RJ (1997) Cocaine: pathophysiology and clinical toxicology. *Heart Lung*. 26(6):466-83; quiz 484-5.
- Bortolotti F, Gottardo R, Pascali J, Tagliaro F (2012) Toxicokinetics of cocaine and metabolites: the forensic toxicological approach. *Curr Med Chem*. 19(33):5658-63.
- Brady KT, Sonne S, Randall CL, Adinoff B, Malcolm R (1995) Features of cocaine dependence with concurrent alcohol abuse. *Drug Alcohol Depend*. 39(1):69-71.
- Breslin FJ, Johnson BA, Lynch WJ (2010) Effect of topiramate treatment on ethanol consumption in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 207(4):529-34.
- Brimijoin S, Orson F, Kosten TR, Kinsey B, Shen XY, White SJ, Gao Y (2013) Anti-cocaine antibody and butyrylcholinesterase-derived cocaine hydrolase exert cooperative effects on cocaine pharmacokinetics and cocaine-induced locomotor activity in mice. *Chem Biol Interact*. 203(1):212-6.

- Brodie MJ, Covanis A, Gil-Nagel A, Lerche H, Perucca E, Sills GJ, White HS (2011) Antiepileptic drug therapy: does mechanism of action matter? *Epilepsy Behav.* 21(4):331-41.
- Brookoff D, Rotondo MF, Shaw LM, Campbell EA, Fields L (1996) Coacaethylene levels in patients who test positive for cocaine. *Ann Emerg Med.* 27(3):316-20.
- Brower KJ, Blow FC, Hill EM, Mudd SA (1994) Treatment outcome of alcoholics with and without cocaine disorders. *Alcohol Clin Exp Res.* 18(3):734-9.
- Buchta WC, Riegel AC (2015) Chronic cocaine disrupts mesocortical learning mechanisms. *Brain Res.* PMID: 25704202.
- Bunney EB, Appel SB, Brodie MS (2000) Cocaine potentiates ethanol-induced excitation of dopaminergic reward neurons in the ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther.* 293(2):383-9.
- Burattini C, McGeehan AJ, Griffin WC 3rd, Gass JT, Kinder JR, Janak PH, Olive MF (2008) A microdialysis study of extracellular levels of acamprosate and naltrexone in the rat brain following acute and repeated administration. *Addict Biol.* 13(1):70-9.
- Cailhol S, Mormède P (2000) Effects of cocaine-induced sensitization on ethanol drinking: sex and strain differences. *Behav Pharmacol.* 11(5):387-94.
- Camí J, Farré M, González ML, Segura J, de la Torre R (1998) Cocaine metabolism in humans after use of alcohol. Clinical and research implications. *Recent Dev Alcohol.* 14:437-55.
- Camí J, Farré M (2003) Drug addiction. *N Engl J Med.* 349(10):975-86.
- Capriles N, Rodaros D, Sorge RE, Stewart J (2003) A role for the prefrontal cortex in stress- and cocaine- induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 168(1-2):66-74.
- Carroll KM, Fenton LR, Ball SA, Nich C, Frankforter TL, Shi J, Rounsaville BJ (2004) Efficacy of disulfiram and cognitive behavior therapy in cocaine-dependent outpatients: a randomized placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry.* 61(3):264-72.
- Cascales M, Zaragoza A, Diez-Fernández C, Fernández-Simón L (1997) Metabolismo oxidativo de la cocaína en hígado. Monografía IV. Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo. Real Academia Nacional de Farmacia. Páginas 287-309.
- Cederbaum AI (2012) Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis.* 16(4):667-85.
- Chaudhuri A (1997) Neural activity mapping with inducible transcription factors. *Neuroreport.* 8(13):iii-vii.
- Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF (2006) Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron.* 52(3):445-59.
- Ciccocioppo R, Economidou D, Rimondini R, Sommer W, Massi M, Heilig M (2007) Buprenorphine reduces alcohol drinking through activation of the nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor system. *Biol Psychiatry.* 61(1):4-12.

- Clapp P (2012) Current progress in pharmacologic treatment strategies for alcohol dependence. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 5(4):427-35.
- Cohen J, Dervaux A, Laqueille X (2014) [Topiramate in substance-related and addictive disorders]. *Presse Med*. 43(9):892-901.
- Colvis CM, Pollock JD, Goodman RH, Impey S, Dunn J, Mandel G, Champagne FA, Mayford M, Korzus E, Kumar A, Renthal W, Theobald DE, Nestler EJ (2005) Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system. *J Neurosci*. 25(45):10379-89.
- Comer SD, Mogali S, Saccone PA, Askalsky P, Martinez D, Walker EA, Jones JD, Vosburg SK, Cooper ZD, Roux P, Sullivan MA, Manubay JM, Rubin E, Pines A, Berkower EL, Haney M, Foltin RW (2013) Effects of acute oral naltrexone on the subjective and physiological effects of oral D-amphetamine and smoked cocaine in cocaine abusers. *Neuropsychopharmacology*. 38(12):2427-38.
- Cone EJ (1995) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *J Anal Toxicol*. 19(6):459-78.
- Connors NJ, Hoffman RS (2013) Experimental treatments for cocaine toxicity: a difficult transition to the bedside. *J Pharmacol Exp Ther*. 347(2):251-7.
- Cook MN, Ware DD, Boone EM, Hou X, Morse AC, Reed CL, Erwin VG, Jones BC (1998) Ethanol modulates cocaine-induced behavioral change in inbred mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 59(3):567-75.
- Corbett AD, Henderson G, McKnight AT, Paterson SJ (2006) 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br J Pharmacol*. 147 Suppl 1:S153-62.
- Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH (2010) Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol*. 3(1):12-29.
- Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M (2004) Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc Nutr Soc*. 63(1):49-63.
- Crawford DK, Trudell JR, Bertaccini EJ, Li K, Davies DL, Alkana RL (2007) Evidence that ethanol acts on a target in Loop 2 of the extracellular domain of alpha1 glycine receptors. *J Neurochem*. 102(6):2097-109.
- Czachowski CL, Delory MJ (2009) Acamprosate and naltrexone treatment effects on ethanol and sucrose seeking and intake in ethanol-dependent and nondependent rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 204(2):335-48.
- Dackis CA, Kampman KM, Lynch KG, Pettinati HM, O'Brien CP (2005) A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil for cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology*. 30(1):205-11.
- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev*. 28(7):771-84.
- Davis CM, Riley AL (2007) The effects of cocaine preexposure on cocaine-induced taste aversion learning in Fischer and Lewis rat strains. *Pharmacol Biochem Behav*. 87(1):198-202.
- Dayas CV, Liu X, Simms JA, Weiss F (2007) Distinct patterns of neural activation associated with ethanol seeking: effects of naltrexone. *Biol Psychiatry*. 61(8):979-89.

- De La Garza R 2nd, Bubar MJ, Carbone CL, Moeller FG, Newton TF, Anastasio NC, Harper TA, Ware DL, Fuller MA, Holstein GJ, Jayroe JB, Bandak SI, Reiman KZ, Neale AC, Pickford LB, Cunningham KA (2015) Evaluation of the dopamine β -hydroxylase (D β H) inhibitor nepicastat in participants who meet criteria for cocaine use disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 59:40-8.
- de Lima MS, de Oliveira Soares BG, Reisser AA, Farrell M (2002) Pharmacological treatment of cocaine dependence: a systematic review. *Addiction*. 97(8):931-49.
- De Sousa A (2010) The role of topiramate and other anticonvulsants in the treatment of alcohol dependence: a clinical review. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 9(1):45-9.
- Dean RA, Harper ET, Dumaual N, Stoeckel DA, Bosron WF (1992) Effects of ethanol on cocaine metabolism: formation of cocaethylene and norcocaethylene. *Toxicol Appl Pharmacol*. 117(1):1-8.
- Dean RA, Christian CD, Sample RH, Bosron WF (1991) Human liver cocaine esterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine. *FASEB J*. 5(12):2735-9.
- Degenhardt L, Hall W (2012) Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. *Lancet*. 379(9810):55-70.
- DeHaven-Hudkins DL, Brostrom PA, Allen JT, Lesko LJ, Ferkany JW, Kaplita PV, Mavunkel BJ, Rzeszotarski WJ, Steranka LR (1990) Pharmacologic profile of NPC 168 (naltrexone phenyl oxime), a novel compound with activity at opioid receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 37(3):497-504.
- Di Ciano P, Benham-Hermetz J, Fogg AP, Osborne GE (2007) Role of the prelimbic cortex in the acquisition, re-acquisition or persistence of responding for a drug-paired conditioned reinforcer. *Neuroscience*. 150(2):291-8.
- Diamond I, Gordon AS (1997) Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol Rev*. 77(1):1-20.
- Ding ZM, Oster SM, Hauser SR, Toalston JE, Bell RL, McBride WJ, Rodd ZA (2012) Synergistic self-administration of ethanol and cocaine directly into the posterior ventral tegmental area: involvement of serotonin-3 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 340(1):202-9.
- Dixon R, Gentile J, Hsu HB, Hsiao J, Howes J, Garg D, Weidler D (1987) Nalmefene: safety and kinetics after single and multiple oral doses of a new opioid antagonist. *J Clin Pharmacol*. 27(3):233-9.
- Dobi A, Seabold GK, Christensen CH, Bock R, Alvarez VA (2011) Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal. *J Neurosci*. 31(5):1895-904.
- Dodgson SJ, Shank RP, Maryanoff BE (2000) Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Epilepsia*. 41 Suppl 1:S35-9.
- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA (2007) Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res*. 5(10):981-9.
- Douaihy AB, Kelly TM, Sullivan C (2013) Medications for substance use disorders. *Soc Work Public Health*. 28(3-4):264-78.

- Dubowski KM (1985) Absorption, distribution and elimination of alcohol: highway safety aspects. *J Stud Alcohol Suppl.* 10:98-108.
- EDADES (2013) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Secretaría de Estado de Servicios Sociales e Igualdad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. EDADES 2013-2014: Encuesta sobre alcohol y drogas en España.
- EMA (2013) European Medicines Agency. Selincro, Nalmefene. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002583/human_med_001620.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
- Emmerson PJ, Liu MR, Woods JH, Medzihradsky F (1994) Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. *J Pharmacol Exp Ther.* 271(3):1630-7.
- ENCODE Project Consortium (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 489(7414):57-74.
- Erwin BL, Slaton RM (2014) Varenicline in the treatment of alcohol use disorders. *Ann Pharmacother.* 48(11):1445-55.
- Everitt BJ, Hutcheson DM, Ersche KD, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW (2007) The orbital prefrontal cortex and drug addiction in laboratory animals and humans. *Ann N Y Acad Sci.* 1121:576-97.
- Faingold CL, N'Gouemo P, Riaz A (1998) Ethanol and neurotransmitter interactions--from molecular to integrative effects. *Prog Neurobiol.* 55(5):509-35.
- FDA (1996, 2004) U.S. Food and Drug Administration. FDA Approved Drug Products. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Label_ApprovalHistory#apphist
- Feeney GF, Connor JP, Young RM, Tucker J, McPherson A (2006) Combined acamprosate and naltrexone, with cognitive behavioural therapy is superior to either medication alone for alcohol abstinence: a single centres' experience with pharmacotherapy. *Alcohol Alcohol.* 41(3):321-7.
- Feltenstein MW, See RE (2008) The neurocircuitry of addiction: an overview. *Br J Pharmacol.* 154(2):261-74.
- Feng J, Nestler EJ (2013) Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Curr Opin Neurobiol.* 23(4):521-8.
- Ferreira MP, Willoughby D (2008) Alcohol consumption: the good, the bad, and the indifferent. *Appl Physiol Nutr Metab.* 33(1):12-20.
- Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR (2007) New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:681-98.
- Franck J, Jayaram-Lindström N (2013) Pharmacotherapy for alcohol dependence: status of current treatments. *Curr Opin Neurobiol.* 23(4):692-9.
- Froehlich JC, Hausauer BJ, Rasmussen DD (2013) Combining naltrexone and prazosin in a single oral medication decreases alcohol drinking more effectively than does either drug alone. *Alcohol Clin Exp Res.* 37(10):1763-70.

- Furieri FA, Nakamura-Palacios EM (2007) Gabapentin reduces alcohol consumption and craving: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*. 68(11):1691-700.
- Gabriel KI, Cunningham CL (2005) Effects of topiramate on ethanol and saccharin consumption and preferences in C57BL/6J mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 29(1):75-80.
- Gainetdinov RR, Caron MG (2003) Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 43:261-84.
- Gal TJ, DiFazio CA, Dixon R (1986) Prolonged blockade of opioid effect with oral nalmefene. *Clin Pharmacol Ther*. 40(5):537-42.
- Garbutt JC (2010) Efficacy and tolerability of naltrexone in the management of alcohol dependence. *Curr Pharm Des*. 16(19):2091-7.
- Garbutt JC, Kranzler HR, O'Malley SS, Gastfriend DR, Pettinati HM, Silverman BL, Loewy JW, Ehrich EW; Vivitrex Study Group (2005) Efficacy and tolerability of long-acting injectable naltrexone for alcohol dependence: a randomized controlled trial. *JAMA*. 293(13):1617-25. Erratum in: *JAMA*. 2005 27;293(16):1978.
- Garbutt JC, West SL, Carey TS, Lohr KN, Crews FT (1999) Pharmacological treatment of alcohol dependence: a review of the evidence. *JAMA*. 281(14):1318-25.
- García Robles R, Ayala Ramírez PA, Perdomo Velásquez SP (2012) Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud*. 10(1):59-71.
- Gardner EL (2011) Addiction and brain reward and antireward pathways. *Adv Psychosom Med*. 30:22-60.
- Gelernter J, Gueorguieva R, Kranzler HR, Zhang H, Cramer J, Rosenheck R, Krystal JH; VA Cooperative Study #425 Study Group (2007) Opioid receptor gene (OPRM1, OPRK1, and OPRD1) variants and response to naltrexone treatment for alcohol dependence: results from the VA Cooperative Study. *Alcohol Clin Exp Res*. 31(4):555-63.
- George TP, Chawarski MC, Pakes J, Carroll KM, Kosten TR, Schottenfeld RS (2000) Disulfiram versus placebo for cocaine dependence in buprenorphine-maintained subjects: a preliminary trial. *Biol Psychiatry*. 47(12):1080-6.
- Ghitza UE, Preston KL, Epstein DH, Kuwabara H, Endres CJ, Bencherif B, Boyd SJ, Copersino ML, Frost JJ, Gorelick DA (2010) Brain mu-opioid receptor binding predicts treatment outcome in cocaine-abusing outpatients. *Biol Psychiatry*. 68(8):697-703.
- Giannini AJ, Loisele RH, Graham BH, Folts DJ (1993) Behavioral response to buspirone in cocaine and phencyclidine withdrawal. *J Subst Abuse Treat*. 10(6):523-7.
- Gianoulakis C (1998) Alcohol-seeking behavior: the roles of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the endogenous opioid system. *Alcohol Health Res World*. 22(3):202-10.
- Gilpin NW, Richardson HN, Koob GF (2008) Effects of CRF1-receptor and opioid-receptor antagonists on dependence-induced increases in alcohol drinking by alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 32(9):1535-42.
- Glauser J, Queen JR (2007) An overview of non-cardiac cocaine toxicity. *J Emerg Med*. 32(2):181-6.

- Goldstein RA, DesLauriers C, Burda AM (2009) Cocaine: history, social implications, and toxicity—a review. *Dis Mon.* 55(1):6-38.
- Goldstein RZ, Volkow ND (2011) Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci.* 12(11):652-69.
- Goldstein RZ, Leskovjan AC, Hoff AL, Hitzemann R, Bashan F, Khalsa SS, Wang GJ, Fowler JS, Volkow ND (2004) Severity of neuropsychological impairment in cocaine and alcohol addiction: association with metabolism in the prefrontal cortex. *Neuropsychologia.* 42(11):1447-58.
- Golovko AI, Golovko SI, Leontieva LV, Zefirov SY (2002) The influence of ethanol on the functional status of GABA(A) receptors. *Biochemistry (Mosc).* 67(7):719-29.
- Goodwin FL, Campisi M, Babinska I, Amit Z (2001) Effects of naltrexone on the intake of ethanol and flavored solutions in rats. *Alcohol.* 25(1):9-19.
- Gorelick DA, Kim YK, Bencherif B, Boyd SJ, Nelson R, Copersino ML, Dannals RF, Frost JJ (2008) Brain mu-opioid receptor binding: relationship to relapse to cocaine use after monitored abstinence. *Psychopharmacology (Berl).* 200(4):475-86.
- Gorelick DA, Kim YK, Bencherif B, Boyd SJ, Nelson R, Copersino M, Endres CJ, Dannals RF, Frost JJ (2005) Imaging brain mu-opioid receptors in abstinent cocaine users: time course and relation to cocaine craving. *Biol Psychiatry.* 57(12):1573-82.
- Gossop M, Manning V, Ridge G (2006) Concurrent use and order of use of cocaine and alcohol: behavioural differences between users of crack cocaine and cocaine powder. *Addiction.* 101(9):1292-8.
- Gossop M, Manning V, Ridge G (2006) Concurrent use of alcohol and cocaine: differences in patterns of use and problems among users of crack cocaine and cocaine powder. *Alcohol Alcohol.* 41(2):121-5.
- Goudie AJ, Dickins DW, Thornton EW (1978) Cocaine-induced conditioned taste aversions in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 8(6):757-61.
- Grabowski J, Rhoades H, Stotts A, Cowan K, Kopecky C, Dougherty A, Moeller FG, Hassan S, Schmitz J (2004) Agonist-like or antagonist-like treatment for cocaine dependence with methadone for heroin dependence: two double-blind randomized clinical trials. *Neuropsychopharmacology.* 29(5):969-81.
- Grant BF, Harford TC (1990) Concurrent and simultaneous use of alcohol with cocaine: results of national survey. *Drug Alcohol Depend.* 25(1):97-104.
- Grassi MC, Cioce AM, Giudici FD, Antonilli L, Nencini P (2007) Short-term efficacy of Disulfiram or Naltrexone in reducing positive urinalysis for both cocaine and cocaethylene in cocaine abusers: a pilot study. *Pharmacol Res.* 55(2):117-21.
- Graziani M, Nencini P, Nisticò R (2014) Genders and the concurrent use of cocaine and alcohol: Pharmacological aspects. *Pharmacol Res.* 87:60-70.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Uylings HB (1997) The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. *J Psychopharmacol.* 11(2):99-106.

- Gryder DS, Rogawski MA (2003) Selective antagonism of GluR5 kainate-receptor-mediated synaptic currents by topiramate in rat basolateral amygdala neurons. *J Neurosci.* 23(18):7069-74.
- Guerri C (2000) Cómo actúa el alcohol en nuestro cerebro. *Trastornos Adictivos.* 2:14-25.
- Gual A (2002) Monografía alcohol. *Adicciones.* Vol. 14, suplemento 1.
- Hammarberg A, Jayaram-Lindström N, Beck O, Franck J, Reid MS (2009) The effects of acamprosate on alcohol-cue reactivity and alcohol priming in dependent patients: a randomized controlled trial. *Psychopharmacology (Berl).* 205(1):53-62.
- Harper C, Matsumoto I (2005) Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol.* 5(1):73-8.
- Harper C (1998) The neuropathology of alcohol-specific brain damage, or does alcohol damage the brain? *J Neuropathol Exp Neurol.* 57(2):101-10.
- Hart CL, Haney M, Vosburg SK, Rubin E, Foltin RW (2008) Smoked cocaine self-administration is decreased by modafinil. *Neuropsychopharmacology.* 33(4):761-8.
- Hauser SR, Wilden JA, Deehan GA Jr, McBride WJ, Rodd ZA (2014) Cocaine influences alcohol-seeking behavior and relapse drinking in alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 38(10):2678-86.
- Hauser SR, Hedlund PB, Roberts AJ, Sari Y, Bell RL, Engleman EA (2015) The 5-HT₇ receptor as a potential target for treating drug and alcohol abuse. *Front Neurosci.* 8:448.
- Hayes DJ, Jupp B, Sawiak SJ, Merlo E, Caprioli D, Dalley JW (2014) Brain γ -aminobutyric acid: a neglected role in impulsivity. *Eur J Neurosci.* 39(11):1921-32.
- Hearn WL, Rose S, Wagner J, Ciarleglio A, Mash DC (1991) Cocaethylene is more potent than cocaine in mediating lethality. *Pharmacol Biochem Behav.* 39(2):531-3.
- Hearn WL, Flynn DD, Hime GW, Rose S, Cofino JC, Mantero-Atienza E, Wetli CV, Mash DC (1991) Cocaethylene: a unique cocaine metabolite displays high affinity for the dopamine transporter. *J Neurochem.* 56(2):698-701.
- Hedaya MA, Pan WJ (1996) Cocaine and alcohol interactions in naive and alcohol-pretreated rats. *Drug Metab Dispos.* 24(7):807-12.
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev.* 27(6):555-79.
- Heil SH, Badger GJ, Higgins ST (2001) Alcohol dependence among cocaine-dependent outpatients: demographics, drug use, treatment outcome and other characteristics. *J Stud Alcohol.* 62(1):14-22.
- Heilig M, Egli M (2006) Pharmacological treatment of alcohol dependence: target symptoms and target mechanisms. *Pharmacol Ther.* 111(3):855-76.
- Henderson-Redmond A, Czachowski C (2014) Effects of systemic opioid receptor ligands on ethanol- and sucrose seeking and drinking in alcohol-preferring (P) and Long Evans rats. *Psychopharmacology (Berl).* 231(22):4309-21.

- Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev.* 28(3):370-490.
- Herrero AI, Del Olmo N, González-Escalada JR, Solís JM (2002) Two new actions of topiramate: inhibition of depolarizing GABA(A)-mediated responses and activation of a potassium conductance. *Neuropharmacology.* 42(2):210-20.
- Hersh D, Van Kirk JR, Kranzler HR (1998) Naltrexone treatment of comorbid alcohol and cocaine use disorders. *Psychopharmacology (Berl).* 139(1-2):44-52.
- Herz A (1997) Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl).* 129(2):99-111.
- Heyser CJ, Moc K, Koob GF (2003) Effects of naltrexone alone and in combination with acamprosate on the alcohol deprivation effect in rats. *Neuropsychopharmacology.* 28(8):1463-71.
- Higuera-Matas A, Montoya GL, Coria SM, Miguéns M, García-Lecumberri C, Ambrosio E (2011) Differential gene expression in the nucleus accumbens and frontal cortex of lewis and Fischer 344 rats relevant to drug addiction. *Curr Neuropharmacol.* 9(1):143-50.
- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ (1994) Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron.* 13(5):1235-44.
- Hopf FW, Lesscher HM (2014) Rodent models for compulsive alcohol intake. *Alcohol.* 48(3):253-64.
- Houdi AA, Bardo MT, Van Loon GR (1989) Opioid mediation of cocaine-induced hyperactivity and reinforcement. *Brain Res.* 497(1):195-8.
- Hu W, Morris B, Carrasco A, Kroener S (2015) Effects of acamprosate on attentional set-shifting and cellular function in the prefrontal cortex of chronic alcohol-exposed mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 39(6):953-61.
- Hunt WA (1996) Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain—a review. *Alcohol.* 13(2):147-51.
- Ikegami A, Olsen CM, Fleming SM, Guerra EE, Bittner MA, Wagner J, Duvauchelle CL (2002) Intravenous ethanol/cocaine self-administration initiates high intake of intravenous ethanol alone. *Pharmacol Biochem Behav.* 72(4):787-94.
- Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ (2010) MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci.* 13(9):1120-7.
- Ingman K, Hagelberg N, Aalto S, Någren K, Juhakoski A, Karhuvaara S, Kallio A, Oikonen V, Hietala J, Scheinin H (2005) Prolonged central mu-opioid receptor occupancy after single and repeated nalmefene dosing. *Neuropsychopharmacology.* 30(12):2245-53.
- Innocenti A, Villar R, Martinez-Merino V, Gil MJ, Scozzafava A, Vullo D, Supuran CT (2005) Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with benzo[b]thiophene 1,1-dioxide sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett.* 15(21):4872-6.
- Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 33 Suppl:245-54.

- Janeczek P, Lewohl JM (2013) The role of α -synuclein in the pathophysiology of alcoholism. *Neurochem Int.* 63(3):154-62.
- Jansen KL, Darracot-Cankovic R (2001) The nonmedical use of ketamine, part two: A review of problem use and dependence. *J Psychoactive Drugs.* 33(2):151-8.
- Jasinska AJ, Chen BT, Bonci A, Stein EA (2015) Dorsal medial prefrontal cortex (MPFC) circuitry in rodent models of cocaine use: implications for drug addiction therapies. *Addict Biol.* 20(2):215-26.
- Jaworska J, Ziemka-Nalecz M, Zalewska T (2015) Histone deacetylases 1 and 2 are required for brain development. *Int J Dev Biol.* 59(4-6):171-7.
- Jayaram P, Steketee JD (2004) Effects of repeated cocaine on medial prefrontal cortical GABAB receptor modulation of neurotransmission in the mesocorticolimbic dopamine system. *J Neurochem.* 90(4):839-47.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science.* 293(5532):1074-80.
- Johnson BA, Seneviratne C, Wang XQ, Ait-Daoud N, Li MD (2013) Determination of genotype combinations that can predict the outcome of the treatment of alcohol dependence using the 5-HT(3) antagonist ondansetron. *Am J Psychiatry.* 170(9):1020-31.
- Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Gunderson EW, Haughey HM, Wang XQ, Liu L (2013) Topiramate's effects on cocaine-induced subjective mood, craving and preference for money over drug taking. *Addict Biol.* 18(3):405-16.
- Johnson BA, Ait-Daoud N, Wang XQ, Penberthy JK, Javors MA, Seneviratne C, Liu L (2013) Topiramate for the treatment of cocaine addiction: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry.* 70(12):1338-46.
- Johnson BA (2010) Medication treatment of different types of alcoholism. *Am J Psychiatry.* 167(6):630-9.
- Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Javors MA, Harrison JM, Elkashef A, Mojsiak J, Li SH, Bloch DA (2006) A preliminary randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of ondansetron in the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend.* 84(3):256-63.
- Johnson BA (2005) Recent advances in the development of treatments for alcohol and cocaine dependence: focus on topiramate and other modulators of GABA or glutamate function. *CNS Drugs.* 19(10):873-96.
- Johnson BA (2004) Uses of topiramate in the treatment of alcohol dependence. *Expert Rev Neurother.* 4(5):751-8.
- Johnson BA, Ait-Daoud N, Bowden CL, DiClemente CC, Roache JD, Lawson K, Javors MA, Ma JZ (2003) Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomised controlled trial. *Lancet.* 361(9370):1677-85.
- Johnson BA, O'Malley SS, Ciraulo DA, Roache JD, Chambers RA, Sarid-Segal O, Couper D (2003) Dose-ranging kinetics and behavioral pharmacology of naltrexone and acamprosate, both alone and combined, in alcohol-dependent subjects. *J Clin Psychopharmacol.* 23(3):281-93.

- June HL, Grey C, Warren-Reese C, Durr LF, Ricks-Cord A, Johnson A, McCane S, Williams LS, Mason D, Cummings R, Lawrence A (1998) The opioid receptor antagonist nalmefene reduces responding maintained by ethanol presentation: preclinical studies in ethanol-preferring and outbred Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 22(9):2174-85.
- Kahn R, Biswas K, Childress AR, Shoptaw S, Fudala PJ, Gorgon L, Montoya I, Collins J, McSherry F, Li SH, Chiang N, Alathari H, Watson D, Liberto J, Beresford T, Stock C, Wallace C, Gruber V, Elkashef A (2009) Multi-center trial of baclofen for abstinence initiation in severe cocaine-dependent individuals. *Drug Alcohol Depend*. 103(1-2):59-64.
- Kalechstein AD, Mahoney JJ 3rd, Yoon JH, Bennett R, De la Garza R 2nd (2013) Modafinil, but not escitalopram, improves working memory and sustained attention in long-term, high-dose cocaine users. *Neuropharmacology*. 64:472-8.
- Kalivas PW, O'Brien C (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology*. 33(1):166-80.
- Kalivas PW (2005) How do we determine which drug-induced neuroplastic changes are important? *Nat Neurosci*. 8(11):1440-1.
- Kalivas PW, Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev*. 16(3):223-44.
- Kampman KM, Lynch KG, Pettinati HM, Spratt K, Wierzbicki MR, Dackis C, O'Brien CP (2015) A double blind, placebo controlled trial of modafinil for the treatment of cocaine dependence without co-morbid alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend*. 155:105-10.
- Kampman KM, Pettinati H, Lynch KG, Dackis C, Sparkman T, Weigley C, O'Brien CP (2004) A pilot trial of topiramate for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend*. 75(3):233-40.
- Katz JL, Terry P, Witkin JM (1992) Comparative behavioral pharmacology and toxicology of cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaine ethyl-ester (cocaethylene). *Life Sci*. 50(18):1351-61.
- Kelley AE, Berridge KC (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci*. 22(9):3306-11.
- Kelz MB, Nestler EJ (2000) deltaFosB: a molecular switch underlying long-term neural plasticity. *Curr Opin Neurol*. 13(6):715-20.
- Kenna GA, Lomastro TL, Schiesl A, Leggio L, Swift RM (2009) Review of topiramate: an antiepileptic for the treatment of alcohol dependence. *Curr Drug Abuse Rev*. 2(2):135-42.
- Kenna GA, Nielsen DM, Mello P, Schiesl A, Swift RM (2007) Pharmacotherapy of dual substance abuse and dependence. *CNS Drugs*. 21(3):213-37.
- Kenny PJ (2014) Epigenetics, microRNA, and addiction. *Dialogues Clin Neurosci*. 16(3):335-44.
- Kiefer F, Jahn H, Tarnaske T, Helwig H, Briken P, Holzbach R, Kämpf P, Stracke R, Baehr M, Naber D, Wiedemann K (2003) Comparing and combining naltrexone and acamprosate in relapse prevention of alcoholism: a double-blind, placebo-controlled study. *Arch Gen Psychiatry*. 60(1):92-9.
- Killcross S, Coutureau E (2003) Coordination of actions and habits in the medial prefrontal cortex of rats. *Cereb Cortex*. 13(4):400-8.

- Kim JH, Lawrence AJ (2014) Drugs currently in Phase II clinical trials for cocaine addiction. *Expert Opin Investig Drugs*. 23(8):1105-22.
- Kim SG, Han BD, Park JM, Kim MJ, Stromberg MF(2004) Effect of the combination of naltrexone and acamprosate on alcohol intake in mice. *Psychiatry Clin Neurosci*. 58(1):30-6.
- Kim WY, Kim S, Kim JH (2008) Chronic microinjection of valproic acid into the nucleus accumbens attenuates amphetamine-induced locomotor activity. *Neurosci Lett*. 432(1):54-7.
- Kloss MW, Rosen GM, Rauckman EJ (1983) N-demethylation of cocaine to norcocaine. Evidence for participation by cytochrome P-450 and FAD-containing monooxygenase. *Mol Pharmacol*. 23(2):482-5.
- Knackstedt LA, Ben-Shahar O, Ettenberg A (2006) Alcohol consumption is preferred to water in rats pretreated with intravenous cocaine. *Pharmacol Biochem Behav*. 85(1):281-6.
- Knapp CM, Mercado M, Markley TL, Crosby S, Ciraulo DA, Kornetsky C (2007) Zonisamide decreases ethanol intake in rats and mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 87(1):65-72.
- Koob G (2011) Neurobiology of Addiction. *Focus*. 2011; Volume 9, Issue 1:55-65.
- Koob GF (2008) A role for brain stress systems in addiction. *Neuron*. 59(1):11-34.
- Koob GF (2006) The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction*. 101 Suppl 1:23-30.
- Koob GF, Le Moal M (2005) Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. *Nat Neurosci*. 8(11):1442-4.
- Koob GF, Le Moal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*. 24(2):97-129.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*. 278(5335):52-8.
- Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 35(1):217-38. Erratum in: *Neuropsychopharmacology*. (2010) 35(4):1051.
- Kosten T, Domingo C, Orson F, Kinsey B (2014) Vaccines against stimulants: cocaine and MA. *Br J Clin Pharmacol*. 77(2):368-74.
- Kosten TR, Wu G, Huang W, Harding MJ, Hamon SC, Lappalainen J, Nielsen DA (2013) Pharmacogenetic randomized trial for cocaine abuse: disulfiram and dopamine β -hydroxylase. *Biol Psychiatry*. 73(3):219-24.
- Krampe H, Ehrenreich H (2010) Supervised disulfiram as adjunct to psychotherapy in alcoholism treatment. *Curr Pharm Des*. 16(19):2076-90.
- Kranzler HR, Gage A (2008) Acamprosate efficacy in alcohol-dependent patients: summary of results from three pivotal trials. *Am J Addict*. 17(1):70-6.
- Kranzler HR, Van Kirk J (2001) Efficacy of naltrexone and acamprosate for alcoholism treatment: a meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res*. 25(9):1335-41.

- Kravitz AV, Tomasi D, LeBlanc KH, Baler R, Volkow ND, Bonci A, Ferré S (2015) Cortico-striatal circuits: Novel therapeutic targets for substance use disorders. *Brain Res.* PMID: 25863130.
- Kreek MJ, Levran O, Reed B, Schlussman SD, Zhou Y, Butelman ER (2012) Opiate addiction and cocaine addiction: underlying molecular neurobiology and genetics. *J Clin Invest.* 122(10):3387-93.
- Kreek MJ, Bart G, Lilly C, LaForge KS, Nielsen DA (2005) Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments. *Pharmacol Rev.* 57(1):1-26.
- Kreek MJ, Nielsen DA, LaForge KS (2004) Genes associated with addiction: alcoholism, opiate, and cocaine addiction. *Neuromolecular Med.* 5(1):85-108.
- Krishnan-Sarin S, Krystal JH, Shi J, Pittman B, O'Malley SS (2007) Family history of alcoholism influences naltrexone-induced reduction in alcohol drinking. *Biol Psychiatry.* 62(6):694-7.
- Kubik S, Miyashita T, Guzowski JF (2007) Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn Mem.* 14(11):758-70.
- Kulaga V, Shor S, Koren G (2010) Correlation between drugs of abuse and alcohol by hair analysis: parents at risk for having children with fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol.* 44(7-8):615-21.
- Kumar A, Choi KH, Renthall W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ (2005) Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron.* 48(2):303-14.
- Kunko PM, French D, Izenwasser S (1998) Alterations in locomotor activity during chronic cocaine administration: effect on dopamine receptors and interaction with opioids. *J Pharmacol Exp Ther.* 285(1):277-84.
- L K (1990) The Cerebral Cortex of the Rat. Bryan Kolb and Richard C. Tees, Eds. MIT Press, Cambridge, MA, 1990. xii, A Bradford Book. *Science.* 250(4986):1457.
- Laizure SC, Mandrell T, Gades NM, Parker RB (2003) Cocaethylene metabolism and interaction with cocaine and ethanol: role of carboxylesterases. *Drug Metab Dispos.* 31(1):16-20.
- Landry MJ (1992) An overview of cocaethylene, an alcohol-derived, psychoactive, cocaine metabolite. *J Psychoactive Drugs.* 24(3):273-6.
- Lankenau SE, Bloom JJ, Shin C (2010) Longitudinal trajectories of ketamine use among young injection drug users. *Int J Drug Policy.* 21(4):306-14.
- LaPlant Q, Vialou V, Covington HE 3rd, Dumitriu D, Feng J, Warren BL, Maze I, Dietz DM, Watts EL, Iñiguez SD, Koo JW, Mouzon E, Renthall W, Hollis F, Wang H, Noonan MA, Ren Y, Eisch AJ, Bolaños CA, Kabbaj M, Xiao G, Neve RL, Hurd YL, Oosting RS, Fan G, Morrison JH, Nestler EJ (2010) Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci.* 13(9):1137-43.
- LaRowe SD, Kalivas PW, Nicholas JS, Randall PK, Mardikian PN, Malcolm RJ (2013) A double-blind placebo-controlled trial of N-acetylcysteine in the treatment of cocaine dependence. *Am J Addict.* 22(5):443-52.
- Lê AD, Poulos CX, Harding S, Watchus J, Juzysch W, Shaham Y (1999) Effects of naltrexone and fluoxetine on alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking induced by priming injections of alcohol and exposure to stress. *Neuropsychopharmacology.* 21(3):435-44.

- Le Moal M, Koob GF (2007) Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol.* 17(6-7):377-93.
- Leal G, Comprido D, Duarte CB (2014) BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 76 Pt C:639-56.
- Leikin J, Paloucek F (2008) Poisoning and Toxicology Handbook. Fourth Edition. Informa Healthcare USA, Inc. New York.
- Lesscher HM, Hordijk M, Bondar NP, Alekseyenko OV, Burbach JP, van Ree JM, Gerrits MA (2005) Mu-opioid receptors are not involved in acute cocaine-induced locomotor activity nor in development of cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology.* 30(2):278-85.
- Li J, Cheng Y, Bian W, Liu X, Zhang C, Ye JH (2010) Region-specific induction of FosB/ Δ FosB by voluntary alcohol intake: effects of naltrexone. *Alcohol Clin Exp Res.* 34(10):1742-50.
- Litten RZ, Ryan ML, Fertig JB, Falk DE, Johnson B, Dunn KE, Green AI, Pettinati HM, Ciraulo DA, Sarid-Segal O, Kampman K, Brunette MF, Strain EC, Tiouririne NA, Ransom J, Scott C, Stout R; NCIG (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Clinical Investigations Group) Study Group (2013) A double-blind, placebo-controlled trial assessing the efficacy of varenicline tartrate for alcohol dependence. *J Addict Med.* 7(4):277-86.
- Littleton J, Zieglgänsberger W (2003) Pharmacological mechanisms of naltrexone and acamprosate in the prevention of relapse in alcohol dependence. *Am J Addict.* 12 Suppl 1:S3-11.
- Liu K, Steketee JD (2011) Repeated exposure to cocaine alters medial prefrontal cortex dopamine D2-like receptor modulation of glutamate and dopamine neurotransmission within the mesocorticolimbic system. *J Neurochem.* 119(2):332-41.
- Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P (2002) Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones.* 14(1):57-64.
- Loeblich S, Nedivi E (2009) The function of activity-regulated genes in the nervous system. *Physiol Rev.* 89(4):1079-103.
- Lombardi PM, Cole KE, Dowling DP, Christianson DW (2011) Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr Opin Struct Biol.* 21(6):735-43.
- López-Moreno JA, Marcos M, Calleja-Conde J, Echeverry-Alzate V, Bühler KM, Costa-Alba P, Bernardo E, Laso FJ, Rodríguez de Fonseca F, Nadal R, Viveros MP, Maldonado R, Giné E (2015) Histone Deacetylase Gene Expression Following Binge Alcohol Consumption in Rats and Humans. *Alcohol Clin Exp Res.* 39(10):1939-50.
- Lovinger DM, White G, Weight FF (1989) Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science.* 243(4899):1721-4.
- Lu X, Wang L, Yu C, Yu D, Yu G (2015) Histone Acetylation Modifiers in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci.* 9:226.
- Lynch WJ, Bond C, Breslin FJ, Johnson BA (2011) Severity of drinking as a predictor of efficacy of the combination of ondansetron and topiramate in rat models of ethanol consumption and relapse. *Psychopharmacology (Berl).* 217(1):3-12.

- Lüscher C, Malenka RC (2011) Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*. 69(4):650-63.
- Macdonald S, Pakula B, Martin G, Wells S, Borges G, Roth E, Salmon A, Stockwell T, Callaghan RC (2014) Health profiles of clients in substance abuse treatment: a comparison of clients dependent on alcohol or cocaine with those concurrently dependent. *Subst Use Misuse*. 49(14):1899-907.
- Maisel NC, Blodgett JC, Wilbourne PL, Humphreys K, Finney JW (2013) Meta-analysis of naltrexone and acamprosate for treating alcohol use disorders: when are these medications most helpful? *Addiction*. 108(2):275-93.
- Malcolm R, Swayngim K, Donovan JL, DeVane CL, Elkashef A, Chiang N, Khan R, Mojsiak J, Myrick DL, Hedden S, Cochran K, Woolson RF (2006) Modafinil and cocaine interactions. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 32(4):577-87.
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci*. 29(4):225-32.
- Mann K, Lemenager T, Hoffmann S, Reinhard I, Hermann D, Batra A, Berner M, Wodarz N, Heinz A, Smolka MN, Zimmermann US, Wellek S, Kiefer F, Anton RF; PREDICT Study Team (2013) Results of a double-blind, placebo-controlled pharmacotherapy trial in alcoholism conducted in Germany and comparison with the US COMBINE study. *Addict Biol*. 18(6):937-46.
- Mann K (2004) Pharmacotherapy of alcohol dependence: a review of the clinical data. *CNS Drugs*. 18(8):485-504.
- Mannelli P, Peindl KS, Wu LT (2011) Pharmacological enhancement of naltrexone treatment for opioid dependence: a review. *Subst Abuse Rehabil*. 2011(2):113-123.
- Marchant NJ, Kaganovsky K, Shaham Y, Bossert JM (2014) Role of corticostriatal circuits in context-induced reinstatement of drug seeking. *Brain Res*.
- Marchitti SA, Bocker C, Stagos D, Vasiliou V (2008) Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 4(6):697-720.
- Marek E, Kraft WK (2014) Ethanol pharmacokinetics in neonates and infants. *Curr Ther Res Clin Exp*. 76:90-7.
- Mariani JJ, Levin FR (2012) Psychostimulant treatment of cocaine dependence. *Psychiatr Clin North Am*. 35(2):425-39.
- Mariani JJ, Pavlicova M, Bisaga A, Nunes EV, Brooks DJ, Levin FR (2012) Extended-release mixed amphetamine salts and topiramate for cocaine dependence: a randomized controlled trial. *Biol Psychiatry*. 72(11):950-6.
- Marinelli PW, Quirion R, Gianoulakis C (2003) Estradiol valerate and alcohol intake: a comparison between Wistar and Lewis rats and the putative role of endorphins. *Behav Brain Res* 139(1-2):59-67.
- Mason BJ, Quello S, Goodell V, Shadan F, Kyle M, Begovic A (2014) Gabapentin treatment for alcohol dependence: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med*. 174(1):70-7.
- Mason BJ, Leher P (2012) Acamprosate for alcohol dependence: a sex-specific meta-analysis based on individual patient data. *Alcohol Clin Exp Res*. 36(3):497-508.

- Mason BJ (2013) Acamprosate in the treatment of alcohol dependence. *Expert Opin Pharmacother.* 6(12):2103-15.
- Mason BJ, Salvato FR, Williams LD, Ritvo EC, Cutler RB (1999) A double-blind, placebo-controlled study of oral nalmefene for alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry.* 56(8):719-24.
- Masur J, Souza-Formigoni ML, Pires ML (1989) Increased stimulatory effect by the combined administration of cocaine and alcohol in mice. *Alcohol.* 6(3):181-2.
- Mattson BJ, Koya E, Simmons DE, Mitchell TB, Berkow A, Crombag HS, Hope BT (2008) Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci.* 27(1):202-12.
- Maze I, Feng J, Wilkinson MB, Sun H, Shen L, Nestler EJ (2011) Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(7):3035-40.
- McCance-Katz EF, Kosten TR, Jatlow P (1998) Concurrent use of cocaine and alcohol is more potent and potentially more toxic than use of either alone—a multiple-dose study. *Biol Psychiatry.* 44(4):250-9.
- McClure EA, Gipson CD, Malcolm RJ, Kalivas PW, Gray KM (2014) Potential role of N-acetylcysteine in the management of substance use disorders. *CNS Drugs.* 28(2):95-106.
- McFarland K, Lapish CC, Kalivas PW (2003) Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci.* 23(8):3531-7.
- McKee BL, Meshul CK (2005) Time-dependent changes in extracellular glutamate in the rat dorsolateral striatum following a single cocaine injection. *Neuroscience.* 133(2):605-13.
- Mehler MF (2008) Epigenetics and the nervous system. *Ann Neurol.* 64(6):602-17.
- Meini M, Moncini M, Cecconi D, Cellesi V, Biasci L, Simoni G, Ameglio M, Pellegrini M, Forgione RN, Rucci P (2011) Aripiprazole and ropinirole treatment for cocaine dependence: evidence from a pilot study. *Curr Pharm Des.* 17(14):1376-83.
- Meini M, Capovani B, Sbrana A, Massei GJ, Ravani L, Massimetti G, Daini L, Scaramelli D, Moncini M (2008) A pilot open-label trial of ropinirole for cocaine dependence. *Am J Addict.* 17(2):165-6.
- Mello NK, Lukas SE, Bree MP, Mendelson JH (1990) Desipramine effects on cocaine self-administration by rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend.* 26(2):103-16.
- Minozzi S, Amato L, Davoli M, Farrell MF, Lima Reisser AA, Pani PP, Silva de Lima M, Soares BG, Vecchi S (2015) WITHDRAWN: Anticonvulsants for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev.* 3:CD006754.
- Minzenberg MJ, Carter CS (2008) Modafinil: a review of neurochemical actions and effects on cognition. *Neuropsychopharmacology.* 33(7):1477-502.
- Miranda R Jr, MacKillop J, Monti PM, Rohsenow DJ, Tidey J, Gwaltney C, Swift R, Ray L, McGeary J (2008) Effects of topiramate on urge to drink and the subjective effects of alcohol: a preliminary laboratory study. *Alcohol Clin Exp Res.* 32(3):489-97.

- Misra AL, Nayak PK, Bloch R, Mulé SJ (1975) Estimation and disposition of [3H]benzoylecgonine and pharmacological activity of some cocaine metabolites. *J Pharm Pharmacol*. 27(10):784-6.
- Mitchell JM, Teague CH, Kayser AS, Bartlett SE, Fields HL (2012) Varenicline decreases alcohol consumption in heavy-drinking smokers. *Psychopharmacology (Berl)*. 223(3):299-306.
- Moeller FG, Dougherty DM, Barratt ES, Schmitz JM, Swann AC, Grabowski J (2001) The impact of impulsivity on cocaine use and retention in treatment. *J Subst Abuse Treat*. 21(4):193-8.
- Moonat S, Starkman BG, Sakharkar A, Pandey SC (2010) Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci*. 67(1):73-88.
- Mooney ME, Schmitz JM, Moeller FG, Grabowski J (2007) Safety, tolerability and efficacy of levodopa-carbidopa treatment for cocaine dependence: two double-blind, randomized, clinical trials. *Drug Alcohol Depend*. 88(2-3):214-23.
- Moore CF, Lynch WJ (2015) Alcohol preferring (P) rats as a model for examining sex differences in alcohol use disorder and its treatment. *Pharmacol Biochem Behav*. 132:1-9.
- Moore CF, Protzuk OA, Johnson BA, Lynch WJ (2014) The efficacy of a low dose combination of topiramate and naltrexone on ethanol reinforcement and consumption in rat models. *Pharmacol Biochem Behav*. 116:107-15.
- Moore LD, Le T, Fan G (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 38(1):23-38.
- Moratalla R (2008) Neurobiología de la cocaína. *Trastornos Adictivos*. 10(3):143-50.
- Moratalla R, Elibol B, Vallejo M, Graybiel AM (1996) Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. *Neuron*. 17(1):147-56.
- Moselhy HF, Georgiou G, Kahn A (2001) Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. *Alcohol Alcohol*. 36(5):357-68.
- Muriach M, López-Pedrajas R, Barcia JM, Sanchez-Villarejo MV, Almansa I, Romero FJ (2010) Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. *J Neurochem*. 114(3):675-84.
- Myrick H, Anton RF, Li X, Henderson S, Randall PK, Voronin K (2008) Effect of naltrexone and ondansetron on alcohol cue-induced activation of the ventral striatum in alcohol-dependent people. *Arch Gen Psychiatry*. 65(4):466-75.
- Müller CA, Geisel O, Banas R, Heinz A (2014) Current pharmacological treatment approaches for alcohol dependence. *Expert Opin Pharmacother*. 15(4):471-81.
- Navarrete F, Rubio G, Manzanares J (2014) Effects of naltrexone plus topiramate on ethanol self-administration and tyrosine hydroxylase gene expression changes. *Addict Biol*. 19(5):862-73.
- Navarrete F, Pérez-Ortiz JM, Manzanares J (2012) Pregabalin- and topiramate-mediated regulation of cognitive and motor impulsivity in DBA/2 mice. *Br J Pharmacol*. 167(1):183-95.
- Negus SS, Henningfield J (2015) Agonist Medications for the Treatment of Cocaine Use Disorder. *Neuropsychopharmacology*. 40(8):1815-25.

- Nestler EJ (2014) Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*. 76 Pt B:259-68.
- Nestler EJ (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci*. 8(11):1445-9.
- Nestler EJ (2005) The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect*. 3(1):4-10.
- Nestler EJ (2004) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci*. 25(4):210-8.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2(2):119-28. Review. Erratum in: *Nat Rev Neurosci*. 2(3):215.
- Nestler EJ, Kelz MB, Chen J (1999) DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res*. 835(1):10-7.
- Nestler EJ, Aghajanian GK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science*. 278(5335):58-63.
- Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL (1993) Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron*. 11(6):995-1006.
- Niciu MJ, Mason GF (2014) Neuroimaging in Alcohol and Drug Dependence. *Curr Behav Neurosci Rep*. 1(1):45-54.
- Nielsen DA, Utrankar A, Reyes JA, Simons DD, Kosten TR (2012) Epigenetics of drug abuse: predisposition or response. *Pharmacogenomics*. 13(10):1149-60.
- Nieratschker V, Batra A, Fallgatter AJ (2013) Genetics and epigenetics of alcohol dependence. *J Mol Psychiatry*. 1(1):11.
- Nieto-Barrera M (2002) Características e indicaciones del topiramato. *REV NEUROL*. 35(1):S88-95.
- Nocente R, Vitali M, Balducci G, Enea D, Kranzler HR, Ceccanti M (2013) Varenicline and neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a new approach to the treatment of co-occurring alcohol and nicotine addiction? *Am J Addict*. 22(5):453-9.
- Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, Horvath TL, Sinclair DA, Pfluger PT, Tschöp MH (2012) Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev*. 92(3):1479-514.
- Norberg A, Jones AW, Hahn RG, Gabrielsson JL (2003) Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clin Pharmacokinet*. 42(1):1-31.
- Nuijten M, Blanken P, van den Brink W, Hendriks V (2011) Cocaine Addiction Treatments to improve Control and reduce Harm (CATCH): new pharmacological treatment options for crack-cocaine dependence in the Netherlands. *BMC Psychiatry*. 11:135.
- Nunes EV, Levin FR (2004). Treatment of depression in patients with alcohol or other drug dependence: a meta-analysis. *JAMA*. 291(15):1887-96.
- O'Connor AD, Rusyniak DE, Bruno A (2005) Cerebrovascular and cardiovascular complications of alcohol and sympathomimetic drug abuse. *Med Clin North Am*. 89(6):1343-58.
- O'Malley SS, Krishnan-Sarin S, Farren C, Sinha R, Kreek MJ (2002) Naltrexone decreases craving and alcohol self-administration in alcohol-dependent subjects and activates the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Psychopharmacology (Berl)*. 160(1):19-29.

- Odeleye OE, Watson RR, Eskelson CD, Earnest D (1993) Enhancement of cocaine-induced hepatotoxicity by ethanol. *Drug Alcohol Depend.* 31(3):253-63.
- OEDT (2012) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Secretaría de Estado de Servicios Sociales e Igualdad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Informe Nacional 2012 (datos del 2011) al OEDT por el Punto Focal Nacional Reitox. España, evolución, tendencias y cuestiones particulares.
- OEDT (2013) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Secretaría de Estado de Servicios Sociales e Igualdad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Informe Nacional 2013 (datos del 2012) al OEDT por el Punto Focal Nacional Reitox. España, evolución y tendencias.
- Okuno H (2011) Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neurosci Res.* 69(3):175-86.
- Oliveto A, Poling J, Mancino MJ, Feldman Z, Cubells JF, Pruzinsky R, Gonsai K, Cargile C, Sofuoglu M, Chopra MP, Gonzalez-Haddad G, Carroll KM, Kosten TR (2011) Randomized, double blind, placebo-controlled trial of disulfiram for the treatment of cocaine dependence in methadone-stabilized patients. *Drug Alcohol Depend.* 113(2-3):184-91.
- Olthuis JV, Darredeau C, Barrett SP (2013) Substance use initiation: the role of simultaneous polysubstance use. *Drug Alcohol Rev.* 32(1):67-71.
- Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD, Cheng X, Bestor TH (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature.* 448(7154):714-7.
- Ortinski PI (2014) Cocaine-induced changes in NMDA receptor signaling. *Mol Neurobiol.* 50(2):494-506.
- Ostlund SB, Balleine BW (2005) Lesions of medial prefrontal cortex disrupt the acquisition but not the expression of goal-directed learning. *J Neurosci.* 25(34):7763-70.
- Otero NK, Thomas JD, Saski CA, Xia X, Kelly SJ (2012) Choline supplementation and DNA methylation in the hippocampus and prefrontal cortex of rats exposed to alcohol during development. *Alcohol Clin Exp Res.* 36(10):1701-9.
- Padula A, McGuier N, Griffin W, Lopez M, Becker H, Mulholland P (2013) Novel anticonvulsants for reducing alcohol consumption: A review of evidence from preclinical rodent drinking models. *OA Alcohol.* 1(1):2.
- Paille F, Martini H (2014) Nalmefene: a new approach to the treatment of alcohol dependence. *Subst Abuse Rehabil.* 5:87-94.
- Pan WJ, Hedaya MA (1999) Cocaine and alcohol interactions in the rat: effect of cocaine and alcohol pretreatments on cocaine pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci.* 88(12):1266-74.
- Pan WJ, Hedaya MA (1999) Cocaine and alcohol interactions in the rat: contribution of cocaine metabolites to the pharmacological effects. *J Pharm Sci.* 88(4):468-76.
- Pan WJ, Hedaya MA (1999) Cocaine and alcohol interactions in the rat: effect on cocaine pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci.* 88(4):459-67.

- Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A (2008) Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci.* 28(14):3729-37.
- Parker RB, Laizure SC (2010) The effect of ethanol on oral cocaine pharmacokinetics reveals an unrecognized class of ethanol-mediated drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 38(2):317-22.
- Parsegian A, See RE (2014) Dysregulation of dopamine and glutamate release in the prefrontal cortex and nucleus accumbens following methamphetamine self-administration and during reinstatement in rats. *Neuropsychopharmacology.* 39(4):811-22
- Patel MB, Opreanu M, Shah AJ, Pandya K, Bhadula R, Abela GS, Thakur RK (2009) Cocaine and alcohol: a potential lethal duo. *Am J Med.* 122(1):e5-6.
- Pennings EJ, Leccese AP, Wolff FA (2002) Effects of concurrent use of alcohol and cocaine. *Addiction.* 97(7):773-83.
- Peoples RW, Li C, Weight FF (1996) Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36:185-201.
- Perez-Reyes M (1994) The order of drug administration: its effects on the interaction between cocaine and ethanol. *Life Sci.* 55(7):541-50.
- Perez-Reyes M, Jeffcoat AR (1992) Ethanol/cocaine interaction: cocaine and cocaethylene plasma concentrations and their relationship to subjective and cardiovascular effects. *Life Sci.* 51(8):553-63.
- Perkins A, Lehmann C, Lawrence RC, Kelly SJ (2013) Alcohol exposure during development: Impact on the epigenome. *Int J Dev Neurosci.* 31(6):391-7.
- Perrotti LI, Weaver RR, Robison B, Renthal W, Maze I, Yazdani S, Elmore RG, Knapp DJ, Selley DE, Martin BR, Sim-Selley L, Bachtell RK, Self DW, Nestler EJ (2008) Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. *Synapse.* 62(5):358-69.
- Peterson AB, Abel JM, Lynch WJ (2014) Dose-dependent effects of wheel running on cocaine-seeking and prefrontal cortex Bdnf exon IV expression in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 231(7):1305-14.
- Petrakis IL, Carroll KM, Nich C, Gordon LT, McCance-Katz EF, Frankforter T, Rounsaville BJ (2000) Disulfiram treatment for cocaine dependence in methadone-maintained opioid addicts. *Addiction.* 95(2):219-28.
- Pettinati HM, Kampman KM, Lynch KG, Dundon WD, Mahoney EM, Wierzbicki MR, O'Brien CP (2014) A pilot trial of injectable, extended-release naltrexone for the treatment of co-occurring cocaine and alcohol dependence. *Am J Addict.* 23(6):591-7.
- Pettinati HM, Kampman KM, Lynch KG, Xie H, Dackis C, Rabinowitz AR, O'Brien CP (2008) A double blind, placebo-controlled trial that combines disulfiram and naltrexone for treating co-occurring cocaine and alcohol dependence. *Addict Behav.* 33(5):651-67.
- Pettinati HM, Kampman KM, Lynch KG, Suh JJ, Dackis CA, Oslin DW, O'Brien CP (2008) Gender differences with high-dose naltrexone in patients with co-occurring cocaine and alcohol dependence. *J Subst Abuse Treat.* 34(4):378-90.

- Pfefferbaum A, Sullivan EV, Mathalon DH, Shear PK, Rosenbloom MJ, Lim KO (1995) Longitudinal changes in magnetic resonance imaging brain volumes in abstinent and relapsed alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 19(5):1177-91.
- Piazza PV, Deroche-Gamonet V (2013) A multistep general theory of transition to addiction. *Psychopharmacology (Berl).* 229(3):387-413.
- Pickering C, Alsia J, Morud J, Ericson M, Robbins TW, Saderpalm B (2015) Ethanol impairment of spontaneous alternation behaviour and associated changes in medial prefrontal glutamatergic gene expression precede putative markers of dependence. *Pharmacol Biochem Behav.* 132:63-70.
- Pierce RC, Kumaresan V (2006) The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev.* 30(2):215-38.
- Pietrzykowski AZ (2010) The role of microRNAs in drug addiction: a big lesson from tiny molecules. *Int Rev Neurobiol.* 91:1-24.
- Plosker GL (2015) Acamprosate: A Review of Its Use in Alcohol Dependence. *Drugs.* 75(11):1255-68.
- Pomara C, Cassano T, D'Errico S, Bello S, Romano AD, Riezzo I, Serviddio G (2012) Data available on the extent of cocaine use and dependence: biochemistry, pharmacologic effects and global burden of disease of cocaine abusers. *Curr Med Chem.* 19(33):5647-57.
- Ponce G, Jiménez-Arriero MA, Rubio G (2003) Tratamiento farmacológico de la dependencia alcohólica. *Trastornos Adictivos.* 5(1):27-32.
- Ponomarev I (2013) Epigenetic control of gene expression in the alcoholic brain. *Alcohol Res.* 35(1):69-76.
- Ponomarev I, Wang S, Zhang L, Harris RA, Mayfield RD (2012) Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J Neurosci.* 32(5):1884-97.
- Ponsoda X, Jover R, Castell JV, Gómez-Lechón MJ (1992) Potentiation of cocaine hepatotoxicity in human hepatocytes by ethanol. *Toxicol In Vitro.* 6(2):155-8.
- Povlock SL, Schenk JO (1997) A multisubstrate kinetic mechanism of dopamine transport in the nucleus accumbens and its inhibition by cocaine. *J Neurochem.* 69(3):1093-105.
- Qi L, Li X, Zhang S, An D (2006) Genetic regulation by non-coding RNAs. *Sci China C Life Sci.* 49(3):201-17.
- Rahman S, Engleman EA, Bell RL (2015) Nicotinic receptor modulation to treat alcohol and drug dependence. *Front Neurosci.* 8:426.
- Randall T (1992) Cocaine, alcohol mix in body to form even longer lasting, more lethal drug. *JAMA.* 267(8):1043-4.
- Ranganath A, Jacob SN (2015) Doping the Mind: Dopaminergic Modulation of Prefrontal Cortical Cognition. *Neuroscientist.* [Epub ahead of print]
- Rapaka R, Chiang N, Martin B (1997) Pharmacokinetics, Metabolism, and Pharmaceutics of Drugs of Abuse. NIDA Research Monograph 173.

- Reid A, Lingford-Hughes A (2006) Neuropharmacology of addiction. *Psychiatry*. Vol. 5 Issue 12:449-54.
- Reis AD, Castro LA, Faria R, Laranjeira R (2008) Craving decrease with topiramate in outpatient treatment for cocaine dependence: an open label trial. *Rev Bras Psiquiatr*. 30(2):132-5.
- Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE 3rd, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, Graham A, Tsankova N, Kippin TE, Kerstetter KA, Neve RL, Haggarty SJ, McKinsey TA, Bassel-Duby R, Olson EN, Nestler EJ (2007) Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron*. 56(3):517-29.
- Renthal W, Nestler EJ (2008) Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med*. 14(8):341-50.
- Riezzo I, Fiore C, De Carlo D, Pascale N, Neri M, Turillazzi E, Fineschi V (2012) Side effects of cocaine abuse: multiorgan toxicity and pathological consequences. *Curr Med Chem*. 19(33):5624-46.
- Riga D, Matos MR, Glas A, Smit AB, Spijker S, Van den Oever MC (2014) Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. *Front Syst Neurosci*. 8:230.
- Rinn JL, Chang HY (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem*. 81:145-66.
- Roache JD, Kahn R, Newton TF, Wallace CL, Murff WL, De La Garza R 2nd, Rivera O, Anderson A, Mojsiak J, Elkashef A (2011) A double-blind, placebo-controlled assessment of the safety of potential interactions between intravenous cocaine, ethanol, and oral disulfiram. *Drug Alcohol Depend*. 119(1-2):37-45.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*. 18(3):247-91.
- Robison AJ, Nestler EJ (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci*. 12(11):623-37.
- Rodriguez-Espinosa N, Fernandez-Espejo E (2015) Effects of acute and repeated cocaine on markers for neural plasticity within the mesolimbic system in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 232(1):57-62.
- Romieu P, Host L, Gobaille S, Sandner G, Aunis D, Zwiller J (2008) Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J Neurosci*. 28(38):9342-8.
- Ron D, Jurd R (2005) The "ups and downs" of signaling cascades in addiction. *Sci STKE*. (309):re14.
- Rose JE, Woolsey CN (1948) The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 27 (1 vol.):210-32.
- Rose S, Hearn WL, Hime GW, Wetli CV, Rutenber AJ, Mash DC (1990) Cocaine and cocaethylene concentrations in human post mortem cerebral cortex. *Neurosci. Abstr*. 16:11-17.
- Rounsaville BJ, Anton SF, Carroll K, Budde D, Prusoff BA, Gawin F (1991) Psychiatric diagnoses of treatment-seeking cocaine abusers. *Arch Gen Psychiatry*. 48(1):43-51.
- Rubio G, Manzanares J, Jiménez M, Rodríguez-Jiménez R, Martínez I, Iribarren MM, Jiménez-Arriero MA, Ponce G, Palomo T (2008) Use of cocaine by heavy drinkers increases vulnerability to developing alcohol dependence: a 4-year follow-up study. *J Clin Psychiatry*. 69(4):563-70.

- Rubio G, Ponce G, Jiménez-Arriero MA, Palomo T, Manzanares J, Ferre F (2004) Effects of topiramate in the treatment of alcohol dependence. *Pharmacopsychiatry*. 37(1):37-40.
- Rukstalis MR, Stromberg MF, O'Brien CP, Volpicelli JR (2000) 6-beta-naltrexol reduces alcohol consumption in rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 24(10):1593-6.
- Rush CR, Stoops WW, Hays LR (2009) Cocaine effects during D-amphetamine maintenance: a human laboratory analysis of safety, tolerability and efficacy. *Drug Alcohol Depend*. 99(1-3):261-71.
- Resner S, Hackl-Herrwerth A, Leucht S, Lehert P, Vecchi S, Soyka M (2010) Acamprosate for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. 9:CD004332.
- Resner S, Hackl-Herrwerth A, Leucht S, Vecchi S, Srisurapanont M, Soyka M (2010) Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. (12):CD001867.
- Sabban EL, Kvetnanska R (2001) Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci*. 24(2):91-8.
- Sable HJ, White SL, Steinpreis RE (2004) Effects of chronic naltrexone treatment in rats on place preference and locomotor activation after acute administration of cocaethylene or ethanol plus cocaine. *Alcohol*. 33(1):51-61.
- Sadri-Vakili G (2014) Cocaine triggers epigenetic alterations in the corticostriatal circuit. *Brain Res*. pii: S0006-8993(14)01342-0.
- Sala M, Braidà D, Colombo M, Groppetti A, Sacco S, Gori E, Parenti M (1995) Behavioral and biochemical evidence of opioidergic involvement in cocaine sensitization. *J Pharmacol Exp Ther*. 274(1):450-7.
- Sanchis Fortea S, Cuevas Badenes J, Sanchís Arnau MA (1999) Enzimas del metabolismo del etanol: su posible contribución a la predisposición genética del alcoholismo. *Adicciones*. Vol. 11 Núm. 2:115-26.
- Sarasa-Renedo A, Sordo L, Molist G, Hoyos J, Guitart A, Barrio G (2014) Principales daños sanitarios y sociales relacionados con el consumo de alcohol. *Rev Esp Salud Pública*. 88:469-91.
- Satel SL, Gawin FH (1989) Migrainelike headache and cocaine use. *JAMA*. 261(20):2995-6.
- Schindler CW, Goldberg SR (2012) Accelerating cocaine metabolism as an approach to the treatment of cocaine abuse and toxicity. *Future Med Chem*. 4(2):163-75.
- Schmaal L, Veltman DJ, Nederveen A, van den Brink W, Goudriaan AE (2012) N-acetylcysteine normalizes glutamate levels in cocaine-dependent patients: a randomized crossover magnetic resonance spectroscopy study. *Neuropsychopharmacology*. 37(9):2143-52.
- Schmidt HD, McGinty JF, West AE, Sadri-Vakili G (2013) Epigenetics and psychostimulant addiction. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 3(3):a012047.
- Schmitz JM, Green CE, Stotts AL, Lindsay JA, Rathnayaka NS, Grabowski J, Moeller FG (2014) A two-phased screening paradigm for evaluating candidate medications for cocaine cessation or relapse prevention: modafinil, levodopa-carbidopa, naltrexone. *Drug Alcohol Depend*. 136:100-7.

- Schmitz JM, Lindsay JA, Stotts AL, Green CE, Moeller FG (2010) Contingency management and levodopa-carbidopa for cocaine treatment: a comparison of three behavioral targets. *Exp Clin Psychopharmacol.* 18(3):238-44.
- Schmitz JM, Lindsay JA, Green CE, Herin DV, Stotts AL, Moeller FG (2009) High-dose naltrexone therapy for cocaine-alcohol dependence. *Am J Addict.* 18(5):356-62.
- Schmitz JM, Mooney ME, Moeller FG, Stotts AL, Green C, Grabowski J (2008) Levodopa pharmacotherapy for cocaine dependence: choosing the optimal behavioral therapy platform. *Drug Alcohol Depend.* 94(1-3):142-50.
- Schmitz JM, Stotts AL, Sayre SL, DeLaune KA, Grabowski J (2004) Treatment of cocaine-alcohol dependence with naltrexone and relapse prevention therapy. *Am J Addict.* 13(4):333-41.
- Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA (1993) Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 33:639-77.
- Shaham Y, Hope BT (2005) The role of neuroadaptations in relapse to drug seeking. *Nat Neurosci.* 8(11):1437-9.
- Shearer J, Wodak A, van Beek I, Mattick RP, Lewis J (2003) Pilot randomized double blind placebo-controlled study of dexamphetamine for cocaine dependence. *Addiction.* 98(8):1137-41.
- Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 4(4):477-85.
- Shinn AK, Greenfield SF (2010) Topiramate in the treatment of substance-related disorders: a critical review of the literature. *J Clin Psychiatry.* 71(5):634-48.
- Shoptaw S, Yang X, Rotheram-Fuller EJ, Hsieh YC, Kintaudi PC, Charuvastra VC, Ling W (2003) Randomized placebo-controlled trial of baclofen for cocaine dependence: preliminary effects for individuals with chronic patterns of cocaine use. *J Clin Psychiatry.* 64(12):1440-8.
- Shorter D, Kosten TR (2011) Novel pharmacotherapeutic treatments for cocaine addiction. *BMC Med.* 9:119.
- Silva de Lima M, Farrell M, Lima Reisser AA, Soares B (2010) WITHDRAWN: Antidepressants for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev.* (2):CD002950.
- Simpson TL, Malte CA, Dietel B, Tell D, Pocock I, Lyons R, Varon D, Raskind M, Saxon AJ (2015) A pilot trial of prazosin, an alpha-1 adrenergic antagonist, for comorbid alcohol dependence and posttraumatic stress disorder. *Alcohol Clin Exp Res.* 39(5):808-17.
- Simpson TL, Saxon AJ, Meredith CW, Malte CA, McBride B, Ferguson LC, Gross CA, Hart KL, Raskind M (2009) A pilot trial of the alpha-1 adrenergic antagonist, prazosin, for alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 33(2):255-63.
- Skradski S, White HS (2000) Topiramate blocks kainate-evoked cobalt influx into cultured neurons. *Epilepsia.* 41 Suppl 1:S45-7.
- Smith MA, Greene-Naples JL, Felder JN, Iordanou JC, Lyle MA, Walker KL (2009) The effects of repeated opioid administration on locomotor activity: II. Unidirectional cross-sensitization to cocaine. *J Pharmacol Exp Ther.* 330(2):476-86.

- Sng JC, Taniura H, Yoneda Y (2004) A tale of early response genes. *Biol Pharm Bull.* 27(5):606-12. Review.
- Sofuoglu M, Singha A, Kosten TR, McCance-Katz FE, Petrakis I, Oliveto A (2003) Effects of naltrexone and isradipine, alone or in combination, on cocaine responses in humans. *Pharmacol Biochem Behav.* 75(4):801-8.
- Soyka M (2014) Nalmefene for the treatment of alcohol dependence: a current update. *Int J Neuropsychopharmacol.* 17(4):675-84.
- Spanagel R (2009) Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev.* 89(2):649-705.
- Spanagel R, Kiefer F (2008) Drugs for relapse prevention of alcoholism: ten years of progress. *Trends Pharmacol Sci.* 29(3):109-15.
- Spanagel R, Zieglensberger W (1997) Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends Pharmacol Sci.* 18(2):54-9.
- Spealman RD (1995) Noradrenergic involvement in the discriminative stimulus effects of cocaine in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 275(1):53-62.
- Stanley WC, Li B, Bonhaus DW, Johnson LG, Lee K, Porter S, Walker K, Martinez G, Eglen RM, Whiting RL, Hegde SS (1997) Catecholamine modulatory effects of nopicastat (RS-25560-197), a novel, potent and selective inhibitor of dopamine-beta-hydroxylase. *Br J Pharmacol.* 121(8):1803-9.
- Steensland P, Simms JA, Holgate J, Richards JK, Bartlett SE (2007) Varenicline, an $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, selectively decreases ethanol consumption and seeking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(30):12518-23.
- Steketee JD (2005) Cortical mechanisms of cocaine sensitization. *Crit Rev Neurobiol.* 17(2):69-86.
- Stoops WW, Rush CR (2014) Combination pharmacotherapies for stimulant use disorder: a review of clinical findings and recommendations for future research. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 7(3):363-74.
- Stoops WW, Glaser PE, Fillmore MT, Rush CR (2004) Reinforcing, subject-rated, performance and physiological effects of methylphenidate and d-amphetamine in stimulant abusing humans. *J Psychopharmacol.* 18(4):534-43.
- Stromberg MF (2004) The effect of baclofen alone and in combination with naltrexone on ethanol consumption in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 78(4):743-50.
- Stromberg MF, Mackler SA (2005) The effect of cocaine on the expression of motor activity and conditioned place preference in high and low alcohol-preferring Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 82(2):314-9.
- Stromberg MF, Sengpiel T, Mackler SA, Volpicelli JR, O'Brien CP, Vogel WH (2002) Effect of naltrexone on oral consumption of concurrently available ethanol and cocaine in the rat. *Alcohol.* 28(3):169-79.
- Stromberg MF, Volpicelli JR, O'Brien CP (1998) Effects of naltrexone administered repeatedly across 30 or 60 days on ethanol consumption using a limited access procedure in the rat. *Alcohol Clin Exp Res.* 22(9):2186-91.

- Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S (2014) DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol.* 4:80.
- Suzuki MM, Bird A (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.* 9(6):465-76.
- Szulwach KE, Li X, Li Y, Song CX, Wu H, Dai Q, Irier H, Upadhyay AK, Gearing M, Levey AI, Vasanthakumar A, Godley LA, Chang Q, Cheng X, He C, Jin P (2011) 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci.* 14(12):1607-16.
- Tabakoff B, Hoffman PL (2013) The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: an integrative history. *Pharmacol Biochem Behav.* 113:20-37.
- Tanda G, Newman AH, Katz JL (2009) Discovery of drugs to treat cocaine dependence: behavioral and neurochemical effects of atypical dopamine transport inhibitors. *Adv Pharmacol.* 57:253-89.
- Taverna S, Sancini G, Mantegazza M, Franceschetti S, Avanzini G (1999) Inhibition of transient and persistent Na⁺ current fractions by the new anticonvulsant topiramate. *J Pharmacol Exp Ther.* 288(3):960-8.
- Tian W, Zhao M, Li M, Song T, Zhang M, Quan L, Li S, Sun ZS (2012) Reversal of cocaine-conditioned place preference through methyl supplementation in mice: altering global DNA methylation in the prefrontal cortex. *PLoS One.* 7(3):e33435
- Tomkins DM, Sellers EM (2001) Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. *CMAJ.* 164(6):817-21.
- Torres G, Horowitz JM (1996) Individual and combined effects of ethanol and cocaine on intracellular signals and gene expression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 20(4):561-96.
- Turner DC, Robbins TW, Clark L, Aron AR, Dowson J, Sahakian BJ (2003) Cognitive enhancing effects of modafinil in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl).* 165(3):260-9.
- Uemura K, Li YJ, Ohbora Y, Fujimiya T, Komura S (1998) Effects of repeated cocaine administration on alcohol consumption. *J Stud Alcohol.* 59(1):115-8.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A (2001) Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature.* 411(6837):583-7.
- UNODC (2014) United Nation Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2014.
- Unterwald EM, Rubinfeld JM, Kreek MJ (1994) Repeated cocaine administration upregulates kappa and mu, but not delta, opioid receptors. *Neuroreport.* 5(13):1613-6.
- Unterwald EM, Horne-King J, Kreek MJ (1992) Chronic cocaine alters brain mu opioid receptors. *Brain Res.* 584(1-2):314-8.
- Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res.* 146(1-2):3-17.
- Uylings HB, van Eden CG (1990) Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog Brain Res.* 85:31-62.

- Van den Oever MC, Spijker S, Smit AB, De Vries TJ (2010) Prefrontal cortex plasticity mechanisms in drug seeking and relapse. *Neurosci Biobehav Rev.* 35(2):276-84.
- van Huijstee AN, Mansvelder HD (2015) Glutamatergic synaptic plasticity in the mesocorticolimbic system in addiction. *Front Cell Neurosci.* 8:466
- Vargas WM, Bengston L, Gilpin NW, Whitcomb BW, Richardson HN (2014) Alcohol binge drinking during adolescence or dependence during adulthood reduces prefrontal myelin in male rats. *J Neurosci.* 34(44):14777-82.
- Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol.* 154(2):299-315.
- Verheul R, Leher P, Geerlings PJ, Koeter MW, van den Brink W (2005) Predictors of acamprosate efficacy: results from a pooled analysis of seven European trials including 1485 alcohol-dependent patients. *Psychopharmacology (Berl).* 178(2-3):167-73.
- Verplaetse TL, Czachowski CL (2015) Low-dose prazosin alone and in combination with propranolol or naltrexone: effects on ethanol and sucrose seeking and self-administration in the P rat. *Psychopharmacology (Berl).* 232(15):2647-57.
- Vetulani J (2001) Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction. *Pol J Pharmacol.* 53(4):303-17.
- Veyrac A, Besnard A, Caboche J, Davis S, Laroche S (2014) The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity, and memory. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 122:89-129.
- Vilpoux C, Warnault V, Pierrefiche O, Daoust M, Naassila M (2009) Ethanol-sensitive brain regions in rat and mouse: a cartographic review, using immediate early gene expression. *Alcohol Clin Exp Res.* 33(6):945-69.
- Vinson C, Chatterjee R (2012) CG methylation. *Epigenomics.* 4(6):655-63.
- Volkow N (2010) Cocaine. National Institute on Drug Abuse Research Report Series.
- Volkow ND, Baler RD (2014) Addiction science: Uncovering neurobiological complexity. *Neuropharmacology.* 76 Pt B:235-49.
- Volkow ND, Li TK (2004) Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nat Rev Neurosci.* 5(12):963-70.
- Volpicelli JR, Alterman AI, Hayashida M, O'Brien CP (1992) Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry.* 49(11):876-80.
- Vroegop MP, Franssen EJ, van der Voort PH, van den Berg TN, Langeweg RJ, Kramers C (2009) The emergency care of cocaine intoxications. *Neth J Med.* 67(4):122-6.
- Wang Y, Cesena TI, Ohnishi Y, Burger-Caplan R, Lam V, Kirchhoff PD, Larsen SD, Larsen MJ, Nestler EJ, Rudenko G (2012) Small molecule screening identifies regulators of the transcription factor Δ FosB. *ACS Chem Neurosci.* 3(7):546-56.
- Weinshenker D (2010) Cocaine sobers up. *Nat Med.* 16(9):969-70.
- Weiss SR, Post RM, Pert A, Woodward R, Murman D (1989) Context-dependent cocaine sensitization: differential effect of haloperidol on development versus expression. *Pharmacol Biochem Behav.* 34(3):655-61.

- Wetzel HN, Tabet MR, Ball WJ, Norman AB (2014) The effects of a humanized recombinant anti-cocaine monoclonal antibody on the disposition of cocaethylene in mice. *Int Immunopharmacol.* 23(2):387-90.
- White FJ, Kalivas PW (1998) Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend.* 51(1-2):141-53.
- White HS, Brown SD, Woodhead JH, Skeen GA, Wolf HH (2000) Topiramate modulates GABA-evoked currents in murine cortical neurons by a nonbenzodiazepine mechanism. *Epilepsia.* 41 Suppl 1:S17-20.
- White HS, Brown SD, Woodhead JH, Skeen GA, Wolf HH (1997) Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. *Epilepsy Res.* 28(3):167-79.
- White SM, Lambe CJ (2003) The pathophysiology of cocaine abuse. *J Clin Forensic Med.* 10(1):27-39.
- WHO (2014) World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2014. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Williams KL, Broadbridge CL (2009) Potency of naltrexone to reduce ethanol self-administration in rats is greater for subcutaneous versus intraperitoneal injection. *Alcohol.* 43(2):119-26.
- Wirkner K, Poelchen W, Kales L, Molberg K, Scheibler P, Allgaier C, Illes P (1999) Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels. *Neurochem Int.* 35(2):153-62.
- Witkiewitz K, Saville K, Hamreus K (2012) Acamprosate for treatment of alcohol dependence: mechanisms, efficacy, and clinical utility. *Ther Clin Risk Manag.* 8:45-53.
- Wolf ME (2010) Regulation of AMPA receptor trafficking in the nucleus accumbens by dopamine and cocaine. *Neurotox Res.* 18(3-4):393-409.
- Wolf ME, Ferrario CR (2010) AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine. *Neurosci Biobehav Rev.* 35(2):185-211.
- Wolfsohn R, Sanfilippo M, Angrist B (1993) A placebo-controlled trial of L-dopa/carbidopa in early cocaine abstinence. *Neuropsychopharmacology.* 9(1):49-53.
- Wong CC, Mill J, Fernandes C (2011) Drugs and addiction: an introduction to epigenetics. *Addiction.* 106(3):480-9.
- Woolverton WL (1987) Evaluation of the role of norepinephrine in the reinforcing effects of psychomotor stimulants in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav.* 26(4):835-9.
- Xi ZX, Ramamoorthy S, Shen H, Lake R, Samuvel DJ, Kalivas PW (2003) GABA transmission in the nucleus accumbens is altered after withdrawal from repeated cocaine. *J Neurosci.* 15;23(8):3498-505.
- Xue L, Hou S, Yang W, Fang L, Zheng F, Zhan CG (2013) Catalytic activities of a cocaine hydrolase engineered from human butyrylcholinesterase against (+)- and (-)-cocaine. *Chem Biol Interact.* 203(1):57-62.
- Yancey JR, Lumbad J (2011) Opioid antagonists for the treatment of alcohol dependence. *Am Fam Physician.* 84(9):990-2.

- Zahr NM, Kaufman KL, Harper CG (2011) Clinical and pathological features of alcohol-related brain damage. *Nat Rev Neurol.* 7(5):284-94.
- Zakhari S (2013) Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res.* 35(1):6-16.
- Zalewska-Kaszuńska J, Bajer B, Gorska D, Andrzejczak D, Dyr W, Bieakowski P (2013) Effect of repeated treatment with topiramate on voluntary alcohol intake and beta-endorphin plasma level in Warsaw alcohol high-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl).* 225(2):275-81.
- Zhang R, Miao Q, Wang C, Zhao R, Li W, Haile CN, Hao W, Zhang XY (2013) Genome-wide DNA methylation analysis in alcohol dependence. *Addict Biol.* 18(2):392-403.
- Zhang X, Velumian AA, Jones OT, Carlen PL (2000) Modulation of high-voltage-activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate. *Epilepsia.* 41 Suppl 1:S52-60.
- Zhou Z, Enoch MA, Goldman D (2014) Gene expression in the addicted brain. *Int Rev Neurobiol.* 116:251-73.
- Zlebnik NE, Brimijoin S, Gao Y, Saykao AT, Parks RJ, Carroll ME (2014) Long-term reduction of cocaine self-administration in rats treated with adenoviral vector-delivered cocaine hydrolase: evidence for enzymatic activity. *Neuropsychopharmacology.* 39(6):1538-46.
- Zolkowska D, Jain R, Rothman RB, Partilla JS, Roth BL, Setola V, Prisinzano TE, Baumann MH (2009) Evidence for the involvement of dopamine transporters in behavioral stimulant effects of modafinil. *J Pharmacol Exp Ther.* 329(2):738-46.
- Zubieta JK, Gorelick DA, Stauffer R, Ravert HT, Dannals RF, Frost JJ (1996) Increased mu opioid receptor binding detected by PET in cocaine-dependent men is associated with cocaine craving. *Nat Med.* 2(11):1225-9.

ANEXO 1

ARTÍCULOS



Under review

Nalmefene is effective in treating alcohol-cocaine interactions and reduces the alcohol-induced histone deacetylases gene expression in blood

Journal:	<i>British Journal of Pharmacology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Calleja-Conde, Javier; Complutense University, Psychobiology Echeverry-Alzate, Victor; Complutense University, Psychobiology Giné, Elena; Complutense University, Biochemistry Bühler, Kora; Complutense University, Psychobiology Nadal, Roser; Universitat Autònoma de Barcelona, Maldonado, Rafael; Laboratori de Neurofarmacologia. Universitat Pompeu Fabra, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut Rodríguez de Fonseca, Fernando; Institute IBIMA, Gual, Antoni; Hospital Clínic, Barcelona, Department of Psychiatry López-Moreno, Jose Antonio; Complutense University, Psychobiology
Major area of pharmacology:	Addiction
Cross-cutting area:	Pharmacogenomics/pharmacogenetics
Additional area(s):	Translational Pharmacology

SCHOLARONE™
Manuscripts

Histone Deacetylase Gene Expression Following Binge Alcohol Consumption in Rats and Humans

Jose Antonio López-Moreno, Miguel Marcos, Javier Calleja-Conde, Victor Echeverry-Alzate, Kora M. Bühler, Pilar Costa-Alba, Edgar Bernardo, Francisco-Javier Laso, Fernando Rodríguez de Fonseca, Roser Nadal, Maria Paz Viveros, Rafael Maldonado, and Elena Giné

Background: Alcohol binge drinking is one of the most common patterns of excessive alcohol use and recent data would suggest that histone deacetylases (*HDACs*) gene expression profiling could be useful as a biomarker for psychiatric disorders.

Methods: This study aimed to characterize the gene expression patterns of *Hdac 1–11* in samples of rat peripheral blood, liver, heart, prefrontal cortex, and amygdala following repeated binge alcohol consumption and to determine the parallelism of *Hdac* gene expression between rats and humans in peripheral blood. To accomplish this goal, we examined *Hdac* gene expression following 1, 4, or 8 alcohol binges (3 g/kg, orally) in the rat, in patients who were admitted to the hospital emergency department for acute alcohol intoxication, and in rats trained in daily operant alcohol self-administration.

Results: We primarily found that acute alcohol binge reduced gene expression (*Hdac1–10*) in the peripheral blood of alcohol-naïve rats and that this effect was attenuated following repeated alcohol binges. There was also a reduction of *Hdac* gene expression in the liver (*Hdac2,4,5*), whereas there was increased expression in the heart (*Hdac1,7,8*) and amygdala (*Hdac1,2,5*). Additionally, increased blood alcohol concentrations were measured in rat blood at 1 to 4 hours following repeated alcohol binge, and the only group that developed hepatic steatosis (fatty liver) were those animals exposed to 8 alcohol binge events. Finally, both binge consumption of alcohol in humans and daily operant alcohol self-administration in rats increased *Hdac* gene expression in peripheral blood.

Conclusions: Our results suggest that increases in *HDAC* gene expression within the peripheral blood are associated with chronic alcohol consumption, whereas *HDAC* gene expression is reduced following initial exposure to alcohol.

Key Words: Histone Deacetylases, Gene Expression, Alcohol Binge, Human and Rat, Translational Research.

From the Department of Psychobiology (JAL-M, JC-C, VE-A, KMB), School of Psychology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain; Alcoholism Unit (MM, F-JL), Department of Internal Medicine, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; Emergency Department (PC-A), University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; Department of Vascular Biology and Inflammation (EB), Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid, Spain; Fundación IMABIS (FRdF), Laboratorio de Medicina Regenerativa, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain; Psychobiology Unit (RN), School of Psychology, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; Department of Physiology (Animal Physiology II) (MPV), School of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain; Laboratori de Neurofarmacologia (RM), Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; and Department of Cellular Biology (EG), School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

Received for publication April 2, 2015; accepted July 22, 2015.

Reprint requests: Jose Antonio López-Moreno, Laboratorio de Psicobiología, Department of Psychobiology, School of Psychology, Complutense University of Madrid, Campus de Somosaguas, 28223 Madrid, Spain; Tel.: +34-91-3943093; Fax: +34-91-3943189; E-mail: jalopezm@psi.ucm.es

Copyright © 2015 by the Research Society on Alcoholism.

DOI: 10.1111/acer.12850

Alcohol Clin Exp Res, Vol **, No *, 2015: pp 1–12

BINGE ALCOHOL CONSUMPTION is one of the most common patterns of excessive alcohol use (Centers for Disease Control and Prevention, 2014) and can be defined as a drinking pattern that increases the blood alcohol concentration (BAC) by up to 80 mg/dl or more. This generally requires the consumption of at least 4 or 5 drinks (for women and men, respectively) within a span of 2 hours (Crabbe et al., 2011; Fillmore and Jude, 2011; NIAAA, 2015). Binge drinking is associated with many immediate consequences, including intentional and nonintentional injuries, death from overdose, and additional long-term consequences if repeated over time (Crabbe et al., 2011). Chronic binge drinking leads to liver and heart disease, abnormal electrophysiological signals within the brain, and psychological impairment (López-Caneda et al., 2013; Maurage et al., 2012; Parada et al., 2012). Therefore, it would be useful if clinicians had the ability to reliably assess the progression of alcoholism through biomarker analysis, which in addition to identifying individuals suffering from alcohol abuse, would further allow the efficacy of pharmacological interventions to be monitored (Litten et al., 2010).

Common single nucleotide variants underlying drug addiction: more than a decade of research

Kora-Mareen Bühler¹, Elena Giné², Victor Echeverry-Alzate¹, Javier Calleja-Conde¹, Fernando Rodriguez de Fonseca³ & Jose Antonio López-Moreno¹

Department of Psychobiology, School of Psychology¹ and Department of Cellular Biology, School of Medicine,² Complutense University of Madrid, Fundación IMABIS,³ Laboratorio de medicina Regenerativa, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain

ABSTRACT

Drug-related phenotypes are common complex and highly heritable traits. In the last few years, candidate gene (CGAS) and genome-wide association studies (GWAS) have identified a huge number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with drug use, abuse or dependence, mainly related to alcohol or nicotine. Nevertheless, few of these associations have been replicated in independent studies. The aim of this study was to provide a review of the SNPs that have been most significantly associated with alcohol-, nicotine-, cannabis- and cocaine-related phenotypes in humans between the years of 2000 and 2012. To this end, we selected CGAS, GWAS, family-based association and case-only studies published in peer-reviewed international scientific journals (using the PubMed/MEDLINE and Addiction GWAS Resource databases) in which a significant association was reported. A total of 371 studies fit the search criteria. We then filtered SNPs with at least one replication study and performed meta-analysis of the significance of the associations. SNPs in the alcohol metabolizing genes, in the cholinergic gene cluster *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4*, and in the *DRD2* and *ANKK1* genes, are, to date, the most replicated and significant gene variants associated with alcohol- and nicotine-related phenotypes. In the case of cannabis and cocaine, a far fewer number of studies and replications have been reported, indicating either a need for further investigation or that the genetics of cannabis/cocaine addiction are more elusive. This review brings a global state-of-the-art vision of the behavioral genetics of addiction and collaborates on formulation of new hypothesis to guide future work.

Keywords Candidate gene association studies, drug addiction, GWAS, single nucleotide polymorphisms.

Correspondence to: Jose Antonio López-Moreno, Department of Psychobiology, School of Psychology, Complutense University of Madrid, Campus de Somosaguas, Madrid 28223, Spain. E-mail: jalopezm@psi.ucm.es

INTRODUCTION

Like most psychiatric disorders, drug addiction is a common complex disease determined by multiple factors, including genetics. Family, adoption and twin studies have estimated that genetic vulnerability (i.e. the susceptibility to develop a disease because of inherited-genetic components) to drug addiction may be as high as 50 percent (Duaux *et al.* 2000; Ball 2008). Nevertheless, few addiction-risk or protective genes have been validated, and the genetic architecture of drug addiction remains elusive.

Inheritance of a common complex disease is not attributable to a mutation in one single gene (as in a classical Mendelian disorder) but to a combination of effects of several different gene variants (Lander & Schork 1994). A major part of these gene variants are common,

with each having only a small individual effect on disease risk. These common low-effect variants are also called polymorphisms. Polymorphisms are defined as DNA sequence variations that produce more than one alternate form of a particular gene (i.e. alleles) within the population, with the least common allele having a frequency (minor allele frequency—MAF) of a minimum of 1 percent in the population (Twyman & Primrose 2003). The most frequent types of polymorphism are single nucleotide polymorphisms (SNPs), i.e. variants of DNA sequences that differ in one single nucleotide base. Human SNPs are nearly always bi-allelic (although, in principle, an SNP could also be tri- or tetra-allelic), with one allele possessing the ancestral or more common nucleotide, and a second allele in which this ancestral nucleotide is substituted by another. The consequences of such a nucleotide substitution on a gene depend on its

Consequences of early life stress on the expression of endocannabinoid-related genes in the rat brain

Eva M. Marco^a, Victor Echeverry-Alzate^b, Jose Antonio López-Moreno^b, Elena Giné^c, Sara Peñasco^a and Maria Paz Viveros^a

The endocannabinoid system is involved in several physiological and pathological states including anxiety, depression, addiction and other neuropsychiatric disorders. Evidence from human and rodent studies suggests that exposure to early life stress may increase the risk of psychopathology later in life. Indeed, maternal deprivation (MD) (24 h at postnatal day 9) in rats induces behavioural alterations associated with depressive-like and psychotic-like symptoms, as well as important changes in the endocannabinoid system. As most neuropsychiatric disorders first appear at adolescence, and show remarkable sexual dimorphisms in their prevalence and severity, in the present study, we analysed the gene expression of the main components of the brain cannabinoid system in adolescent (postnatal day 46) Wistar male and female rats reared under standard conditions or exposed to MD. For this, we analysed, by real-time quantitative PCR, the expression of genes encoding for CB₁ and CB₂ receptors, TRPV1 and GPR55 (*Cnr1*, *Cnr2a*, *Cnr2b*, *Trpv1*, and *Gpr55*), for the major enzymes of synthesis, *N*-acyl phosphatidyl-ethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) and diacylglycerol lipase (DAGL) (*Nape-pld*, *Dagla* and *Daglb*), and degradation, fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL) (*Faah*, *Magl* and *Cox-2*), in specific brain regions,

that is, the frontal cortex, ventral and dorsal striatum, dorsal hippocampus and amygdala. In males, MD increased the genetic expression of all the genes studied within the frontal cortex, whereas in females such an increase was observed only in the hippocampus. In conclusion, the endocannabinoid system is sensitive to early life stress at the gene expression level in a sex-dependent and region-dependent manner, and these changes are already evident in the adolescent brain. *Behavioural Pharmacology* 25:547–556 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Behavioural Pharmacology 2014, 25:547–556

Keywords: adolescent, cannabinoid, maternal deprivation, polymerase chain reaction, rat, stress

^aDepartment of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Institute of Biomedical Research of the San Carlos Clinical Hospital, ^bDepartment of Psychobiology, Faculty of Psychology, Campus de Somosaguas and ^cDepartment of Biochemistry, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Correspondence to Eva M. Marco, PhD, Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, C/ Jose Antonio Novais, no 12. 28040-Madrid, Spain
E-mail: emmarco@bio.ucm.es

Received 28 February 2014 Accepted as revised 22 June 2014

Introduction

The endocannabinoid system is a neuromodulatory system composed of (a) cannabinoid CB receptors, metabotropic receptors coupled to G-proteins, the CB₁ and CB₂ receptors, (b) endogenous ligands (endocannabinoids), mainly *N*-arachidonylethanolamine [anandamide (AEA)] and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), and (c) enzymes responsible for their synthesis and degradation. Endocannabinoids, because of their lipophilic nature, are synthesized and released 'on demand' by the cleavage of membrane phospholipid precursors; AEA may be formed by the action of the enzyme *N*-acyl phosphatidyl-ethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD), whereas 2-AG is produced by sn-1-selective diacylglycerol lipases (DAGLs). In contrast, endocannabinoid signalling is inactivated by a fatty acid amide hydrolase (FAAH) responsible for AEA hydrolysis and a monoacylglycerol lipase (MAGL) responsible for the hydrolysis and inactivation of 2-AG. Although CB₁ and CB₂ receptors are the main CB receptors, additional receptors have been proposed, that is, the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) ion channel and a G-protein-coupled

receptor, GPR55, among others. More recently, an additional degradative pathway, for both AEA and 2-AG, that involves cyclooxygenase-2 (COX-2) has been proposed (Piomelli, 2003; Di Marzo *et al.*, 2004; Battista *et al.*, 2012).

The endocannabinoid system has been implicated in a wide range of physiological and pathological brain functions. Clinical and animal studies consistently support the central role of the endocannabinoid system in emotional homeostasis, stress responsiveness, energy balance and cognitive function, whereas a deregulation of the endocannabinoid signalling has been related to neuropsychiatric conditions, such as depression, anxiety disorders and schizophrenia (Pacher *et al.*, 2006; Di Marzo and Petrosino, 2007; Moreira *et al.*, 2009; Marco *et al.*, 2011a; López-Moreno *et al.*, 2012; Marco and Laviola, 2012).

Early life stress has long been associated with psychopathology. Indeed, data from both human and animal studies suggest a solid relationship between early life trauma and psychopathology (Heim and Nemeroff, 2001;

Risky alcohol consumption in young people is associated with the fatty acid amide hydrolase gene polymorphism C385A and affective rating of drug pictures

Kora-Mareen Bühler · Evelio Huertas · Víctor Echeverry-Alzate · Elena Giné · Eduardo Moltó · Lluís Montoliu · Jose Antonio López-Moreno

Received: 30 August 2013 / Accepted: 24 December 2013 / Published online: 10 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Drug addiction is a complex disease with overlapping stages and influenced by multiple environmental and genetic factors. In addition to neurobiological changes, repeated drug exposure modulates affective responses to drug stimuli including visual cues. Here, we made a preliminary screening among ten Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) of the *CNR1* (rs806368, rs1049353, rs6454674, rs7766029), *FAAH* (rs324420, rs12075550), *DRD2* (rs6277), *ANKK1* (rs1800497), *COMT* (rs4680), and *OPRM1* (rs1799971) genes to identify that SNPs that were more directly associated with alcohol, tobacco and/or

cannabis consumption in young individuals ($n = 91$). Also, affective rating for alcohol-, tobacco- and cannabis-related pictures was examined in each individual. Our results make it possible to select the rs324420 SNP (C385A) of the *FAAH* gene for further analysis. Increasing the sample size up to $n = 185$ we found that the homozygous CC C385A SNP genotype was associated with risky alcohol use ($p = 0.006$, odds ratio 2.38). Subsequently, we replicated this genetic association with risky alcohol use using another independent sample. Risky drinkers (mean 166.8 g pure alcohol) and smokers (more than 15 cigarettes) rated drug pictures more positively ($p < 0.001$) and they showed a strong positive correlation with drug use during weekends, which is the period in which the first problematic experiences with alcohol and other drugs appear (initial stages of the drug addiction process). As conclusion, because drug addiction is a multi-step process and a preventable disease, our results indicate that the *FAAH* C385A SNP is one of the most promising candidates for individuals who are at higher risk for alcohol problems.

Communicated by S. Hohmann.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00438-013-0809-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K.-M. Bühler · V. Echeverry-Alzate · J. A. López-Moreno (✉)
Department of Psychobiology, Faculty of Psychology,
Complutense University of Madrid, Campus de Somosaguas,
28223 Madrid, Spain
e-mail: jalopezm@psi.ucm.es

E. Huertas
Department of Basic Psychology, Complutense University
of Madrid, Campus de Somosaguas, 28223 Madrid, Spain

E. Giné
Department of Cellular Biology, Faculty of Medicine,
Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

E. Moltó · L. Montoliu
Department of Molecular and Cellular Biology, Centro Nacional
de Biotecnología (CNB-CSIC), Campus de Cantoblanco, Darwin
3, 28049 Madrid, Spain

E. Moltó · L. Montoliu
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades
Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain

Keywords Drug addiction · Evaluative learning · Endocannabinoid system · *FAAH* gene · Genetic association study

Introduction

Drug addiction is a complex disease. Specifically, drug addiction is a multi-step process with overlapping stages (initiation, intermittent use, habituation, escalation, problematic experiences, abstinence and relapse), which are associated with numerous neurobiological alterations (Chao and Nestler 2004; Koob and Volkow 2010; Mandyam and Koob 2012). Current research provides a general

Published in final edited form as:

Synapse. 2013 June ; 67(6): 280–289. doi:10.1002/syn.21639.

A spontaneous deletion of α -synuclein is associated with an increase in CB1 mRNA transcript and receptor expression in the hippocampus and amygdala: effects on alcohol consumption

Alejandro López-Jiménez¹, Nicole A. R. Walter², Elena Giné³, Ángel Santos³, Victor Echeverry-Alzate¹, Kora-Mareen Bühler¹, Pedro Olmos⁴, Stéphanie Giezendanner⁵, Rosario Moratalla⁶, Lluís Montoliu^{7,8}, Kari J. Buck², and Jose Antonio López-Moreno¹

¹Department of Psychobiology, Faculty of Psychology, Campus de Somosaguas, Complutense University, 28223, Madrid, Spain ²Department of Behavioral Neuroscience, Veterans Affairs Medical Center and Oregon Health & Science University, Portland, Oregon 97239-3098

³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain ⁴C.I.E.M.A.T. Avda. Complutense 22. Madrid. Spain ⁵Department of Psychology, University of Bern, Switzerland, Muesmattstrasse 45, 3000 Bern 9, Switzerland ⁶Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avda. Dr. Arce 37, 28002, Madrid, Spain

⁷Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Department of Molecular and Cellular Biology, Campus de Cantoblanco, C/Darwin 3, 28049 Madrid, Spain

⁸Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain

Abstract

α -Synuclein (α -syn) protein and endocannabinoid CB1 receptors are primarily located in presynaptic terminals. An association between α -syn and CB1 receptors has recently been established in Parkinson's disease, but it is completely unknown whether there is an association between these two proteins in alcohol addiction. Therefore, we aimed to examine the α -syn mRNA transcript and protein expression levels in the prefrontal cortex, striatum, amygdala and hippocampus. These brain regions are the most frequently implicated in alcohol and other drug addiction. In these studies, we used C57BL/6 mice carrying a spontaneous deletion of the α -syn gene (C57BL/6^{S α ca^{-/-}}) and their respective controls (C57BL/6^{S α ca^{+/+}}). These animals were monitored for spontaneous alcohol consumption (3–10%) and their response to a hypnotic-sedative dose of alcohol (3 g/kg) was also assessed. Compared with the C57BL/6^{S α ca^{+/+}} mice, we found that the C57BL/6^{S α ca^{-/-}} mice exhibited a higher expression level of the CB1 mRNA transcript and CB1 receptor in the hippocampus and amygdala. Furthermore, C57BL/6^{S α ca^{-/-}} mice showed an increase in alcohol consumption when offered a 10% alcohol solution. There was no significant difference in sleep time after the injection of 3 g/kg alcohol. These results are the first to reveal an association between α -syn and the CB1 receptor in the brain regions that are most frequently implicated in alcohol and other drug addictions.

Corresponding author: Jose Antonio López Moreno, Laboratorio de Psicobiología, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Campus Somosaguas Universidad Complutense de Madrid, E-28223 Madrid, Spain. Telephone no. +34–91–3943093, fax +34–91–3943189, jalopezm@psi.ucm.es, buckk@ohsu.edu.

Conflict of interests

None



Developmentally-induced hypothyroidism alters the expression of Egr-1 and Arc genes and the sensitivity to cannabinoid agonists in the hippocampus. Possible implications for memory and learning

Elena Giné^{a,b}, Victor Echeverry-Alzate^c, Jose Antonio López-Moreno^c, Alejandro López-Jimenez^c, Daniel Torres-Romero^b, Ana Perez-Castillo^{d,e,*}, Angel Santos^{b,*}

^a Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^c Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^d Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, CIBERNED, 28029 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2012

Received in revised form 7 September 2012

Accepted 4 October 2012

Available online 16 October 2012

Keywords:

Thyroid hormone
Cannabinoid
Development
Hippocampus
Spatial memory

ABSTRACT

We analyzed the role of the cannabinoid system in the cognitive deficits caused by developmentally-induced hypothyroidism. We studied in control and hypothyroid rats the effect of a cannabinoid agonist on spatial memory, hippocampal phosphorylation of CREB and expression of early genes. Our results show that, 1-basal hippocampal expression of early genes and spatial learning are decreased in hypothyroid rats; 2-hypothyroid rats are very sensitive to cannabinoid agonists. Low dose of cannabinoid agonist ineffective in controls altered spatial memory, CREB's phosphorylation and early gene expression in hypothyroids. These effects are not due a change in CB1 receptor (CB1R) content. 3-Treatment of hypothyroid rats with thyroid hormones normalized the biochemical and behavioral responses to cannabinoid agonists but did not correct the low basal levels of early gene transcripts and the deficits in spatial learning. All these data suggest that the hippocampal deregulation of early genes expression could play an important role in the basal cognitive deficits of hypothyroid rats.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Thyroid hormones (L-thyroxine (T₄) and 3,5,3'-triiodothyronine (T₃)) play an important role in the regulation of development and metabolism in many mammalian tissues. Most of the actions of these hormones are mediated by the binding of T₃ to specific nuclear receptors. These receptors belong to the *nuclear receptor*

superfamily, which includes, among others, the receptors for steroid hormones, retinoids, vitamin D₃, peroxisomal proliferators and many other proteins without known ligand (orphan receptors) (Aranda and Pascual, 2001). The nuclear receptors are transcription factors, whose activity can be regulated by ligand-dependent and/or ligand-independent mechanisms (Beekun et al., 2009). Thyroid hormone receptors bind to specific DNA sequences in target genes, called thyroid hormone response elements, and regulate transcription initiation in a ligand dependent manner (Aranda and Pascual, 2001; Flamant et al., 2007). Hence the regulation by thyroid hormones of the expression of a number of genes represents their main mechanism of action.

The brain is an important target for thyroid hormones (Bernal, 2007; Williams, 2008), being the perinatal period the most critical for their action. It is during this period when the expression of thyroid hormone receptors in the rat brain increases rapidly (Perez-Castillo et al., 1985) and when the consequences of hypothyroidism are more dramatic, resulting in numerous alterations (Bernal, 2007). The sensitivity of the brain to the action of thyroid hormones depends of the developmental stage of the animals and the specific area being considered. Marked differences in the response to these hormones have been reported in different areas

Abbreviations: CB1R, cannabinoid type 1 receptor; MWM, Morris Water Maze; T₄, L-thyroxine; T₃, 3,5,3'-triiodothyronine; CREB, cAMP responsive element binding protein; WIN 55,212-2, R-(+)-(2,3-dihydro-5-methyl)-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl[(1-naphthalenyl)methanone mesylate; HU210, (-)-11-hydroxy-8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl; SR141716A, N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide hydrochloride; AM251, N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide.

* Corresponding authors. Addresses: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3941446; fax: +34 91 3942691 (A. Santos), Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 5854436; fax: +34 91 5854401 (A. Perez-Castillo).

E-mail addresses: aperez@iib.uam.es (A. Perez-Castillo), piedras3@med.ucm.es (A. Santos).

C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor gene is associated with motor learning and heart rate

E. Huertas^{*,†,§}, K.-M. Bühler^{†,§},
V. Echeverry-Alzate^{†,§}, T. Giménez^{†,§}
and J. A. López-Moreno^{†,§}

[†]Laboratory of Human Experimental Psychology, Department of Basic Psychology, [‡]Laboratory of Psychobiology, Department of Psychobiology, and [§]Faculty of Psychology, Universidad Complutense, Madrid, Spain

*Corresponding author: E. Huertas, Facultad de Psicología, Campus de Somosaguas, 28223 Madrid, Spain. E-mail: ehuertas@psi.ucm.es

Genetic variants that are related to the dopaminergic system have been frequently found to be associated with various neurological and mental disorders. Here, we studied the relationships between some of these genetic variants and some cognitive and psychophysiological processes that are implicated in such disorders. Two single nucleotide polymorphisms were chosen: one in the dopamine D2 receptor gene (rs6277-C957T) and one in the catechol-O-methyltransferase gene (rs4680-Val158Met), which is involved in the metabolic degradation of dopamine. The performance of participants on two long-term memory tasks was assessed: free recall (declarative memory) and mirror drawing (procedural motor learning). Heart rate (HR) was also monitored during the initial trials of the mirror-drawing task, which is considered to be a laboratory middle-stress generator (moderate stress), and during a rest period (low stress). Data were collected from 213 healthy Caucasian university students. The C957T C homozygous participants showed more rapid learning than the T allele carriers in the procedural motor learning task and smaller differences in HR between the moderate- and the low-stress conditions. These results provide useful information regarding phenotypic variance in both healthy individuals and patients.

Keywords: Dopaminergic, genetic polymorphism, heart rate, mirror drawing, procedural memory, recall, stress

Received 25 December 2011, revised 9 March 2012 and 31 March 2012, accepted for publication 3 April 2012

Polymorphisms that are related to dopamine, and more specifically, those that are linked to the dopamine D2 receptor gene (DRD2) and the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene are frequently associated with various neurological and mental disorders characterized by alterations in cognitive

and emotional processes. One of the most clinically relevant single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the DRD2 gene is C957T (rs6277), located at the Pro319 codon in the exon 7. The C allele of the C957T SNP has been associated with low striatal DRD2 availability (Hirvonen *et al.* 2004, 2005) and with high DRD2 binding potential throughout the cortex and thalamus (Hirvonen *et al.* 2009b).

The Val158Met polymorphism (rs4680), which is located in exon 3 of the COMT gene, affects the activity of the COMT enzyme, which degrades dopamine and other catecholamines (Lachman *et al.* 1996). The Met variant shows lower dopamine-degrading activity relative to the Val variant, resulting in higher dopamine levels, particularly within the prefrontal cortex and hippocampus (Chen *et al.* 2004; Dennis *et al.* 2010; Honea *et al.* 2009).

The striatum, one of the structures over which the C957T SNP has functional effects, plays a fundamental role in procedural memory, and more specifically, in skill acquisition (see D'Amours *et al.* 2011; Seger & Spiering 2011). In fact, this type of learning seems to be altered in disorders that affect the presence of dopamine in the striatum, such as Parkinson's disease and Huntington's disease (e.g. Ghilardi *et al.* 2008; Harrington *et al.* 1990; Heindel *et al.* 1989; Muslimovic *et al.* 2007; see also Pendt *et al.* 2011). The Val158Met SNP could also affect this type of learning either directly or indirectly (Dickinson & Elvevåg 2009; Krugel *et al.* 2009).

For their part, the hippocampus and thalamus play fundamental roles in declarative memory, particularly in episodic memory (e.g. Kopelman 1995; Squire 1982; Stewart *et al.* 2009; van der Werf *et al.* 2000). Some studies have suggested that the COMT Met allele is associated with improved performances on declarative memory tasks (e.g. de Frias *et al.* 2004), although other studies have found no association between declarative memory and COMT (e.g. Dennis *et al.* 2010; Schott *et al.* 2006). A possible link between the C957T SNP and declarative memory has not yet been established.

The C957T and Val158Met SNPs have also been linked to stress responsiveness. For example, CC genotype carriers of the C957T SNP showed more persistent high-amplitude skin-conductance responses in threatening situations (Huertas *et al.* 2010). Moreover, an examination of genetically altered mice showed that COMT reduction results in exaggerated stress reactivity (Papaleo *et al.* 2008). The low-activity COMT variant has also been linked to greater stress sensitivity in humans (van Winkel *et al.* 2008).

Therefore, the purpose of this study was to investigate whether the C957T and Val158Met SNPs are functionally related to either procedural memory (mirror-drawing learning) or declarative memory (verbal free recall). We also aimed to study possible links between these SNPs and autonomic

The genetic basis of the endocannabinoid system and drug addiction in humans

Jose Antonio López-Moreno, Victor Echeverry-Alzate and Kora-Mareen Bühler

Journal of Psychopharmacology
26(1) 133–143
© The Author(s) 2012
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0269881111416689
jop.sagepub.com



Abstract

The cannabinoid receptor (*CNR1*) and the fatty acid amide hydrolase (*FAAH*) genes are located on chromosomes 6 and 1 in the 6q15 and 1p33 cytogenetic bands, respectively. *CNR1* encodes a seven-transmembrane domain protein of 472 amino acids, whereas *FAAH* encodes one transmembrane domain of 579 amino acids. Several mutations found in these genes lead to altered mRNA stability and transcription rate or a reduction of the activity of the encoded protein. Increasing evidence shows that these functional mutations are related to dependence upon cocaine, alcohol, marijuana, heroin, nicotine and other drugs. One of the most compelling associations is with the C385A single nucleotide polymorphism (SNP), which is found in the *FAAH* gene. For all of the genetic polymorphisms reviewed here, it is difficult to form overall conclusions due to the high diversity of population samples being studied, ethnicity, the use of volunteers, heterogeneity of the recruitment criteria and the drug addiction phenotype studied. Care should be taken when generalizing the results from different studies. However, many works have repeatedly associated polymorphisms in the *CNR1* and *FAAH* genes with drug-related behaviours; this suggests that these genes should be examined in further genetic studies focusing on drug addiction and other psychiatric disorders.

Keywords

Cannabinoid, *CNR1*, drug addiction, *FAAH*, genetic polymorphism, human, SNP

Introduction

Drug addiction is a chronic, relapsing disease characterized by the compulsion to seek and take a drug, loss of control in limiting intake and emergence of negative emotional states when access to the drug is prevented (Koob and Le Moal, 1997). These emotional, cognitive and behavioural effects are commonly linked to a neurobiological substrate. Many studies have demonstrated that the endogenous cannabinoid system is directly linked to drug addiction. Such findings range from preclinical to clinical trials and include the main legal and illegal drugs used in developed countries: nicotine, alcohol, cannabis, cocaine and opioids (Arnold, 2005; Colombo et al., 2005; López-Moreno et al., 2010; Maldonado et al., 2006; Maldonado and Berrendero, 2010; Piomelli, 2004).

The endocannabinoid system is a signalling system composed of (a) cannabinoid receptors, mainly CB1 and CB2; (b) endogenous ligands for these receptors, i.e. anandamide and 2-arachidonoylglycerol; and (c) enzymes involved in the biosynthesis and deactivation of the endogenous ligands, i.e. fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol (MAG) lipase (Pertwee, 2006; Piomelli, 2003, 2004). The endocannabinoid system is widely expressed throughout the body; however, the CB1 receptor is primarily expressed in the central nervous system. In fact, the CB1 receptor is the most abundant G-coupled receptor in the brain (Herkenham

et al., 1990; Matsuda et al., 1990) and is expressed in the pre-synaptic terminals of GABAergic neurons such as the neocortical, amygdalar and hippocampal neurons, as well as neurons at the outflow nuclei of basal ganglia (Julian et al., 2003; Mackie, 2005; Tsou et al., 1999). There is also dense CB1 expression in telencephalic, cerebellar glutamatergic and cholinergic neurons (Piomelli, 2003; Rodríguez de Fonseca et al., 2005).

Immunocytochemical analysis indicates a complementary pattern of FAAH distribution and CB1 receptor localization (Basavarajappa, 2007). However, there is a lack of CB1 and FAAH complementarity in certain brain areas, such as the thalamic, mesencephalic trigeminal and cerebellar nuclei. FAAH-expressing neurons are widely present in these areas, but CB1 expression is absent. A possible explanation for this phenomenon is the presence of anandamide targets other than the CB1 receptor (Basavarajappa, 2007).

Department of Psychobiology, Faculty of Psychology, Complutense University, Madrid, Spain.

Corresponding author:

Jose Antonio López Moreno, Laboratorio de Psicobiología, Department of Psychobiology, Faculty of Psychology, Complutense University, Campus Somosaguas, E-28223 Madrid, Spain
Email: jalopezm@psi.ucm.es

